



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :

A61K 39/106

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 98/48836

(43) Date de publication internationale: 5 novembre 1998 (05.11.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00875

(22) Date de dépôt international: 30 avril 1998 (30.04.98)

(30) Données relatives à la priorité:

97/05608	30 avril 1997 (30.04.97)	FR
97/15732	8 décembre 1997 (08.12.97)	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIEUX ORAVAX [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GUY, Bruno [FR/FR]; 15B, rue des Noyers, F-69005 Lyon (FR). HAENSLER, Jean [FR/FR]; "Les Bullandières" Bâtiment B, 17, rue Piccandet, F-69290 Saint Genis les Ollières (FR).

(74) Mandataire: AYROLES, Marie-Pauline; Pasteur Mérieux Sérums &amp; Vaccins, Direction Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).

(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.*(54) Title: ANTI-*HELICOBACTER* VACCINE COMPOSITION COMPRISING A TH1 ADJUVANT(54) Titre: COMPOSITION VACCINALE ANTI-*HELICOBACTER* COMPRENANT UN ADJUVANT DE TYPE TH1

(57) Abstract

The invention concerns the use of an immunogenic agent derived from *Helicobacter*, associated with an adjuvant such as QS-21, DC-chol or Bay R1005, for making a pharmaceutical composition designed to induce an immune response of the T helper 1 type (Th1), for preventing or treating *Helicobacter* infection in a mammal.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet l'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter*, en association avec un adjuvant tel que le QS-21, le DC-chol ou le Bay R1005, dans la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée à l'induction d'une réponse immune de type T helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, pour prévenir ou traiter une infection à *Helicobacter* chez un mammifère.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Composition vaccinale anti-*Helicobacter* comprenant un adjuvant de type Th1

La présente invention a pour objet l'usage particulier d'une préparation vaccinale destinée à induire chez un mammifère, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un organisme pathogène infectant des muqueuses, notamment à l'encontre des bactéries *Helicobacter*.

*Helicobacter* est un genre bactérien caractérisé par des bactéries spiralées à gram négatif. Plusieurs espèces colonisent le tractus gastrointestinal des mammifères. On cite en particulier *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. felis* et *H. mustelae*. Bien qu'*H. pylori* soit l'espèce la plus communément associée aux infections humaines, dans certains cas rares, *H. heilmanii* et *H. felis* ont pu être isolés chez l'homme. Une bactérie de type *Helicobacter*, *Gastrospirillum hominis* a également été décrite chez l'homme.

*Helicobacter* infecte plus de 50 % de la population adulte dans les pays développés et près de 100 % de celle des pays en voie de développement ; ce qui en fait un des agents infectieux prédominants au plan mondial.

*H. pylori* est retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de l'estomac chez l'homme et plus particulièrement autour des lésions de cratère des ulcères gastriques et duodénaux. Cette bactérie est à l'heure actuelle reconnue comme l'agent étiologique des gastrites antrales et apparaît comme un des cofacteurs requis pour le développement des ulcères. Par ailleurs, il semble que le développement des carcinomes gastriques puisse être associé à la présence d'*H. pylori*.

Il apparaît donc hautement souhaitable de mettre au point un vaccin en vue de prévenir ou de traiter les infections à *Helicobacter*.

A ce jour, plusieurs protéines d'*Helicobacter* ont déjà été proposées comme antigène vaccinal et la méthode de vaccination qui est couramment préconisée consiste à délivrer l'antigène au niveau de la muqueuse gastrique, c'est-à-dire à l'endroit même où la réponse immune est souhaitée. Pour ce faire, l'administration par voie orale a donc été retenue.

autre que la muqueuse gastrique ; tel que par exemple la muqueuse nasale ou rectale (WO 96/31235). Des lymphocytes stimulés par l'antigène en un territoire muqueux dit inducteur peuvent migrer et circuler de manière sélective pour aller induire une réponse immunitaire en d'autres territoires muqueux, dits effecteurs.

5

Une variante de ces méthodes consiste à effectuer une primo-immunisation par voie systémique avant d'administrer l'antigène par voie nasale.

Pour administration par voie muqueuse, l'antigène, le plus souvent un lysat  
10 bactérien ou une protéine purifiée, est associé à un adjuvant approprié comme la toxine cholérique (CT) ou la heat-labile toxine (LT) d'*E. coli*.

Lorsque l'administration par voie muqueuse est mise en oeuvre, la réponse  
humorale que l'on observe, est de manière prédominante de type IgA. Ceci indique  
15 bien qu'il y a eu une réponse immunitaire locale.

Certains auteurs ont pensé très tôt qu'il existait une bonne corrélation entre une forte réponse de type IgA et un effet protecteur (Czinn et al, Vaccine (1993) 11 : 637). D'autres ont émis un avis plus réservé (Bogstedt et al, Clin. Exp. Immunol.  
20 (1996) 105 : 202). Bien qu'il n'existe pas à ce jour de véritable certitude concernant ce sujet, l'induction d'anticorps qui soient notamment de type IgA, apparaît quoi qu'il en soit souhaitable pour la plupart des auteurs.

De manière générale, l'apparition des IgA témoigne de la mise en oeuvre d'une  
25 réponse de la part des lymphocytes T-helper de type 2 (réponse Th2).

En effet, la stimulation des lymphocytes T-helper par un antigène particulier permet d'obtenir différentes sous-populations de cellules T-helper, caractérisées par des profils de synthèse de cytokines différents.

30

Les cellules Th1 produisent notamment de manière sélective l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tandis que les cellules Th2 sécrètent de préférence l'IL-4, -5, et -10. En raison de leur production différenciée de cytokines, ces deux types de cellules T-helper ont des rôles distincts : les cellules Th1 favorisent  
35 l'immunité à médiation cellulaire *i.e.* une réponse de type inflammatoire, tandis que les cellules Th2 stimulent la réponse humorale de type IgA, IgE et de certaines sous-classes d'IgG. On sait aussi que les cytokines produites par des cellules Th1 de souris



peuvent stimuler la réponse anticorps et en particulier que l'IFN- $\gamma$  induit une réponse IgG2a.

5 Ainsi, des différentes études de l'art antérieur, émerge l'opinion selon laquelle l'induction d'une réponse Th2 caractérisée par l'apparition d'IgA est indispensable, sinon suffisante, afin d'obtenir un effet protecteur.

De manière surprenante, on a maintenant découvert que, même si une réponse Th2 ne nuit pas, il est aussi nécessaire d'induire une forte réponse Th1. En effet, des  
10 résultats expérimentaux démontrent maintenant qu'un effet protecteur peut être corrélé plus aisément avec une réponse Th1 qu'avec une réponse Th2.

Contrairement à ce qui était initialement recherché (D'Elios et al, J. Immunol. (1997) 158 : 962), la présente demande révèle donc l'importance d'induire une  
15 réponse Th1 de type inflammatoire au moment de l'immunisation, sans laquelle on ne peut observer d'effet protecteur.

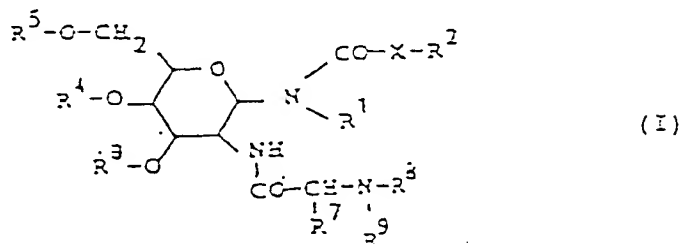
On peut parvenir à induire une réponse Th1 à l'encontre d'*Helicobacter* en jouant sur un certain nombre de facteurs, comme par exemple le type d'adjuvant. On  
20 a en effet mis en évidence qu'en utilisant certains adjuvants on peut obtenir un taux de protection similaire ou supérieur à celui observé lorsque l'on utilise la voie muqueuse et des adjuvants tels que les toxines bactériennes.

En conséquence, la présente invention a pour objet :

- 25
- (a) L'usage conjoint d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, dans la fabrication d'un médicament destiné à être administrée par voie systémique pour prévenir ou traiter une  
30 infection à *Helicobacter*.
  - (b) Une composition pharmaceutique qui comprend un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et au moins un composé (capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*) sélectionné parmi :  
35
    - (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;

(ii) des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, à condition que ces lipides ne soient pas présentés sous forme de liposomes lorsque ladite composition ne contient pas de saponine ni de glycolipopeptide de formule (I) ; et

(iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle :

- 20  $\text{R}^1$  représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone, de préférence 1 à 20 atomes de carbone,
- 25  $\text{X}$  représente  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-$  ou  $-\text{NH}-$ ,
- $\text{R}^2$  représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone, de préférence 1 à 20 atomes de carbone,
- 30  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  et  $\text{R}^5$  représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl- $\text{CO-R}^6$ , dans lequel  $\text{R}^6$  représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,
- 35  $\text{R}^7$  représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_7$ , hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle,

carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,

5 R<sup>8</sup> représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et

R<sup>9</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butylloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et

10

R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

15 (c) L'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins un composé sélectionné parmi les composés (i) à (iii) cités ci dessus, dans la fabrication d'une composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter* ; et

20 (d) Une méthode pour prévenir ou traiter une infection promue par un microorganisme capable d'infecter la muqueuse gastro-duodénale d'un mammifère *e.g.*, une infection à *Helicobacter*, selon laquelle on administre au mammifère par voie systémique, en une ou plusieurs fois, une composition contenant au moins un agent immunogène dérivé dudit microorganisme *e.g.* d'*Helicobacter* et au moins un composé capable de favoriser l'induction d'une  
25 réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre *e.g.*, d'*Helicobacter*.

30 (e) Une méthode pour prévenir ou traiter une infection promue par un microorganisme capable d'infecter la muqueuse gastro-duodénale d'un mammifère *e.g.*, une infection à *Helicobacter*, selon laquelle on administre au mammifère, en une ou plusieurs fois, une composition contenant au moins un agent immunogène dérivé dudit microorganisme *e.g.* d'*Helicobacter* et au moins un composé sélectionné parmi les composés (i) à (iii) cités ci dessus, et par laquelle une réponse immunitaire de type Th1 est induite à l'encontre *e.g.* d'*Helicobacter*.

35

On peut mettre en évidence l'induction d'une réponse Th1 utile aux fins de la présente invention en estimant l'importance relative de la réponse Th1 par rapport à

la réponse Th2, en comparant par exemple les taux d'IgG2a et d'IgG1 induits chez la souris à l'encontre d'*Helicobacter*, qui témoignent respectivement de la mise en oeuvre des réponses Th1 et Th2. En effet, la réponse Th1 que l'on recherche est généralement accompagnée d'une réponse Th2. Néanmoins, on considère que la  
5 réponse Th2 ne doit pas être significativement prédominante par rapport à la réponse Th1. Les taux d'IgG2a et d'IgG1 induits chez la souris peuvent être appréciés de manière conventionnelle à l'aide d'un test ELISA, à condition que les tests utilisés pour chacun des deux sous isotypes soient de même sensibilité et en particulier que les anticorps anti-IgG2a et anti-IgG1 soient de même affinité.

10

Les quantités d'IgG2a et d'IgG1 peuvent être notamment mesurées à l'aide d'un test ELISA identique ou similaire à celui décrit ci-après. Les puits d'une plaque ELISA en polycarbonate sont enduits avec 100 µl d'un extrait bactérien d'*Helicobacter* e.g. *H. pylori* à environ 10 µg/ml dans du tampon carbonate. La  
15 plaque ELISA est incubée 2 heures à 37°C puis une nuit à 4°C. La plaque est lavée avec du tampon PBS (phosphate buffer saline) contenant 0.05 % de Tween 20 (tampon PBS / Tween). Les puits sont saturés avec 250 µl de PBS contenant 1 % de serum albumine bovine afin d'empêcher la liaison non-spécifique des anticorps. Après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est lavée avec le tampon PBS /  
20 Tween. L'antisérum prélevé chez la souris, un certain nombre de jours après que cette dernière ait reçu la composition destinée à l'induction d'une réponse immune de type Th1 à l'encontre d'*Helicobacter*, est dilué en série dans du tampon PBS / Tween. 100 µl des dilutions sont ajoutés dans les puits. La plaque est incubée 90 minutes à 37°C, lavée et évaluée selon des procédures standard. Par exemple, on utilise un  
25 anticorps de chèvre anti-IgG2a ou anti-IgG1 de souris couplé à une enzyme telle que la peroxydase. L'incubation en présence de cet anticorps est poursuivie 90 minutes à 37°C. On lave la plaque puis la réaction est développée avec le substrat approprié (par exemple de l'O-phényldiamine dihydrochloride lorsque l'enzyme utilisée est la peroxydase). La réaction est évaluée par colorimétrie (en mesurant l'absorbance par spectrophotométrie). Le titre de l'antisérum en IgG2a ou en IgG1 correspond à  
30 l'inverse de la dilution donnant une absorbance de 1,5 à 490 nm.

L'induction d'une réponse Th1 utile aux fins de la présente invention est marquée par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 chez la souris qui doit être  
35 supérieur à 1/100, 1/50 ou 1/20, avantageusement supérieur à 1/10, de préférence supérieur à 1/3, de manière tout à fait préférée, supérieur à 1/2, 5 ou 10. Lorsque ce rapport est aux alentours de 1, on parle alors de réponse Th1 / Th2 mixte ou

équilibrée. Lorsque le rapport est supérieur ou égal à 5, on peut alors parler de réponse Th1 prépondérante.

5 L'obtention d'une réponse Th1 (ou Th2) chez la souris est prédictive d'une réponse Th1 (ou Th2) chez l'homme. Bien qu'il soit plus facile d'évaluer le type de réponse chez la souris, on peut le faire également chez l'homme en mesurant les taux des cytokines spécifiques de la réponse Th1 d'une part et d'autre part de la réponse Th2, qui sont induites subséquentement. Les réponses Th1 et Th2 peuvent être évaluées directement chez l'homme l'une par rapport à l'autre sur la base des taux de  
10 cytokines spécifiques des deux types de réponse (voir ci-dessus) *e.g.* sur la base du rapport IFN- $\gamma$  / IL-4.

Alternativement, si la méthode de dosage décrite ci-dessus est mise en oeuvre, on peut prévoir que le titre ELISA qui reflète la quantité d'IgG2a, doit être égal ou  
15 supérieur à 10 000, de préférence égal ou supérieur à 100 000, de manière particulièrement préférée égal ou supérieur à 1 000 000 ; ceci signifie alors que la réponse Th1 est significative.

20 Le mammifère auquel est destinée la composition pharmaceutique ou la méthode est avantageusement un primate, de préférence un humain.

Des saponines utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrites dans le brevet US N° 5,057,540 par référence non à leurs structures mais aux fractions dans lesquelles elles sont présentes après fractionnement d'un extrait aqueux de l'écorce de *Quillaja saponaria* Molina, par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et chromatographie à basse pression sur silice. En particulier on cite les fractions QA-7, QA-17, QA-18 et QA-21 aussi dénommée QS-21. L'usage de cette dernière est particulièrement avantageux. Le QS-21 est connu pour être un adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse immune majoritairement de type Th1.  
25  
30 On parle alors d'adjuvant de type Th1.

Des lipides cationiques utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrits dans le brevet US N° 5,283,185. A titre d'exemple, on cite le iodure de cholesteryl-3 $\beta$ -carboxyl-amido-ethylenetriméthylammonium, le iodure de 1-diméthylamino-3-triméthylammonio-DL-2-propyl-cholesteryl carboxylate, le iodure de cholesteryl-3 $\beta$ -carboxyamidoéthylèneamine, le iodure de cholesteryl-3 $\beta$ -oxysyccinamidoéthylenetriméthylammonium, le iodure de 1-diméthylamino-3-  
35

trimethylammonio-DL-2-propyl-cholesteryl-3 $\beta$ -oxysuccinate, le iodure de 2-[(2-trimethylammonio)-ethylmethylamino] ethyl-cholesteryl-3 $\beta$ -oxysuccinate, le 3 $\beta$ -[N-(polyethyleneimine)-carbamoyl] cholesterol, et le 3 $\beta$  [N-(N', N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-chol) ou un sel de ce dernier. Le  
5 DC-chol (ou sa forme saline) est connu pour être un adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse équilibrée mixte de type Th1 / Th2. On parle alors d'adjuvant de type Th1 / Th2 ou Th1 + Th2.

Ces lipides cationiques peuvent être utilisés en dispersion ou bien mis sous  
10 forme de liposomes. Des liposomes peuvent être réalisés comme cela est décrit dans le brevet US N° 5,283,185, en associant les lipides cationiques avec un phospholipide neutre *e.g.*, la phosphatidylcholine ou la phosphatidylethanolamine.

Des glycolipoptides utiles aux fins de la présente invention sont notamment  
15 décrits dans le brevet US N° 4,855,283 et EP 206,037. Il s'agit en particulier des glycolipides de formule générale (I) dans laquelle un reste de sucre est un reste 2-amino-2-désoxy-D-glucose ou 2-amino-2-désoxy-D-galactose. Le groupe 2-amino de l'amino-sucre peut être lié à la glycine, la sarcosine, l'acide hippurique, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la sérine, la thréonine, la cystéine, la méthionine,  
20 l'ornithine, la citrulline, l'arginine, l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine, la phénylalanine, la tyrosine, la proline, le tryptophane ou l'histidine sous forme D ou L ou avec des acides aminocarboxyliques comme l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, l'acide  $\alpha$ -aminovalérienique, l'acide  $\alpha$ -aminocaproïque ou l'acide  $\alpha$ -aminoheptanoïque sous forme D ou sous forme L.

25

Plus particulièrement, on cite les glycolipoptides suivants :

N-(2-glycinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoyl-  
amide,  
N-(2-glycinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-actadecanoylamide,  
30 N-(2-glycinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-tetradecyl-dodecanoylamide,  
N-(2-L-alaninamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoylamide,  
N-(2-D-alaninamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-octadecanoylamide,  
N-(2-L-phenylalaninamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-octadecanoyl-  
amide,  
35 N-(2-L-valinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide,  
N-(2-L-valinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-tetradecanoylamide,  
N-(2-L-leucinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoylamide,

N-(2-L-leucinamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide (Bay R1005), et  
N-(2-sarcosinamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide.

5 Une composition selon l'invention peut contenir un ou plusieurs composés précédemment cités. Selon un mode avantageux, on utilise deux composés ; (a) l'un étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et (b) l'autre étant sélectionné (i) soit parmi des lipides cationiques ou un sel de ces derniers, lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C  
10 et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, (ii) soit parmi les glycolipeptides de formule  
15 (I). A titre d'exemple on cite les mélanges QS21 + DC-Chol et QS-21 + Bay R1005.

D'autres adjuvants capable de favoriser une réponse immune de type Th1 (c'est-à-dire des adjuvants de type Th1 ou Th1 / Th2) existent dans l'état de la technique parmi lesquels l'homme du métier est capable de sélectionner celui qui  
20 correspond le mieux à ses besoins. A titre indicatif, on cite notamment les liposomes ; les ISCOMS ; les microsphères ; les chocléates protéiques ; les vésicules formées de surfactants non-ioniques ; les dispersions d'amphiphiles cationiques dans de l'eau ; les émulsions huile/eau ; le muramidylpeptide (MDP) et ses dérivés tels que le glucosyl muramidylpeptide (GMDP), le thréonyl-MDP, le muramétide et la  
25 murapalmitine ; ainsi que divers autres composés tels que le monophosphoryl-lipide A (MPLA) lipopolysaccharide majeur de la paroi d'une bactérie, par exemple d'*E. coli*, de *Salmonella minnesota*, de *Salmonella typhimurium* ou de *Shigella flexneri* ; l'algane-glucane ; la gamma-inuline ; le calcitriol et la loxoribine.

30 Des liposomes utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi des liposomes pH-sensibles tels que ceux formés par mélange de d'hémisuccinate de cholestérol (CHEMS) et de dioleyle phosphatidyle éthanolamine (DOPE) ; des liposomes contenant des lipides cationiques reconnus pour leurs propriétés fusiogènes, tels que le 3 bêta -(N-(N',N'-diméthyl aminoéthane)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol) et ses équivalents décrits dans le brevet US N°  
35 5,283,185 et WO 96/14831 ou un sel de ceux-ci, le bromure de dimethyldioctadecylammonium (DDAB) et les composés BAY décrits dans EP

91645 et EP 206 037, par exemple le Bay R1005 (N-(2-desoxy-2-L-leucylamino-bétab-D-glucopyranosyl)-N-octadecyl dodecanoylamide acétate ; et des liposomes contenant du MTP-PE, un dérivé lipophile du MDP (muramidyl dipeptide). Ces liposomes sont utiles pour adjuvanter tous les agents immunogènes cités.

5

Des ISCOMs utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi les ceux composés de QuilA ou de QS-21 associé à du cholestérol et éventuellement aussi à un phospholipide tel que la phosphatidylcholine. Ceux ci sont particulièrement intéressants pour la formulation des antigènes lipidés.

10

Des microsphères utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment formés à partir de composés tels que le polylactide-co-glycolide (PLAGA), l'alginate, le chitosan, le polyphosphazène et de nombreux autres polymères.

15

Des chochléates protéiques utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi ceux formés à partir de cholestérol et éventuellement d'un phospholipide additionnel tel que la phosphatidylcholine. Ceux-ci sont surtout intéressants pour la formulation des antigènes lipidés.

20

Des vésicules formées de surfactants non-ioniques utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment formées par un mélange de 1-monopalmitoyl glycérol de cholestérol et de dicetylphosphate. Elles sont une alternative aux liposomes classiques et peuvent être utilisées pour la formulation de tous les agents immunogènes cités.

25

Des émulsions huile/eau utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnées parmi le MF59 (Biocine-Chiron), le SAF1 (Syntex) et les montanides ISA51 et ISA720 (Seppic).

30

L'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est avantageusement sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.

35

Aux fins de la présente invention, une préparation de bactéries inactivées peut être obtenue selon des méthodes conventionnelles bien connues de l'homme de l'art. Il en est de même d'un lysat bactérien. Une dose de bactéries inactivées ou de lysat



cellulaire, appropriée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, peut être déterminée par l'homme de l'art et dépend d'un certain nombre de facteurs tel que l'individu auquel est destiné le vaccin *e.g.*, âge, de l'antigène lui-même, de la voie et du mode d'administration, de la présence/absence ou du type d'adjuvant, ainsi que  
5 cela peut être déterminé par l'homme de l'art. D'une manière générale, on indique qu'une dose appropriée est d'environ 50 µg à 1 mg à environ 1 mg, de lysat.

Un peptide ou un polypeptide dérivé d'*Helicobacter* peut être purifié à partir d'*Helicobacter* ou obtenu par les techniques du génie génétique ou bien encore par  
10 synthèse chimique. Ce dernier procédé est avantageux dans le cas des peptides. On appelle "peptide" toute chaîne d'acides aminés dont la taille est inférieure à environ 50 acides aminés. Lorsque la taille est supérieure, on utilise le terme de "polypeptide" qui est aussi interchangeable avec le terme "protéine". Un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention peut être identique ou similaire à  
15 celui existant dans les conditions naturelles. Il est similaire en ce qu'il est capable d'induire une réponse immune de la même nature mais il peut comporter certaines variations structurelles comme par exemple une mutation, l'adjonction d'un résidu de nature lipidique ou bien être sous forme de peptide ou de polypeptide de fusion.

20 Une dose du peptide ou du polypeptide, appropriée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, peut être déterminée par l'homme de l'art et dépend d'un certain nombre de facteurs tel que l'individu auquel est destiné le vaccin *e.g.*, âge, de l'antigène lui-même, de la voie et du mode d'administration, de la présence/absence ou du type d'adjuvant, ainsi que cela peut être déterminé par l'homme de l'art. D'une  
25 manière générale, on indique qu'une dose appropriée est d'environ 10 µg à environ 1 mg, de préférence à environ 100 µg.

L'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* peut être n'importe quel polypeptide d'*Helicobacter* *e.g.*, d'*H. pylori*. Il peut notamment s'agir d'un  
30 polypeptide présent dans le cytoplasme, d'un polypeptide de la membrane interne ou externe ou d'un polypeptide sécrété dans le milieu extérieur. De nombreux polypeptides d'*Helicobacter* ont déjà été décrits dans la littérature, soit par référence à leur séquence d'acides aminés déduites de la séquence du gène correspondant cloné ou identifié, soit par référence à un procédé de purification qui permet de les obtenir  
35 sous forme isolée du reste de leur environnement naturel. A titre indicatif, on cite en particulier les document suivants : WO 94/26901 and WO 96/34624 (HspA), WO 94/09023 (CagA), WO 96/38475 (HpaA), WO 93/181150 (cytotoxine), WO

95/27506 et Hazell et al, J. Gen. Microbiol. (1991) 137 : 57 (catalase), FR 2 724 936 (recepteur membranaire de la lactoferrine humaine), WO 96/41880 (AlpA), EP 752 473 (FibA) and O'Toole et al, J. Bact. (1991) 173 : 505 (TsaA). D'autres polypeptides sont aussi décrits dans WO 96/40893, WO 96/33274, WO 96/25430 et  
5 WO 96/33220. Un polypeptide utile aux fins de la présente invention peut être identique ou similaire à l'un de ceux cités en référence dans la mesure où il est capable de promouvoir une réponse immune à l'encontre d'*Helicobacter*. A condition de remplir cette dernière condition, l'agent immunogène peut aussi être un peptide dérivé d'un polypeptide cité en référence.

10

De manière avantageuse, on utilise un polypeptide sélectionné parmi les sous-unités UreA et UreB de l'uréase d'*Helicobacter* (voir WO 90/4030). De préférence, on les utilise toutes les deux, associées en forme d'apoenzyme de l'uréase ou encore sous forme multimérique (voir WO 96/33732).

15

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut contenir un unique agent immunogène ou plusieurs. Par exemple une composition avantageuse peut comprendre UreA et UreB *e.g.*, sous forme d'apoenzyme, ainsi que un ou plusieurs autres polypeptides notamment sélectionnés parmi ceux cités ci-  
20 avant.

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut en outre contenir des composés autres que l'agent immunogène lui-même et l'adjuvant de type Th1 ou Th1/Th2 ; la nature de ces composés dépendant dans une  
25 certaine mesure de la nature de l'agent immunogène, bactéries inactivées, lysat cellulaire, peptide ou polypeptide. Par exemple une composition peut aussi comprendre un adjuvant capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type Th2 *e.g.* un composé d'aluminium tel que l'aluminium hydroxide, l'aluminium phosphate ou l'aluminium hydroxy phosphate. Ceci peut être avantageux dans le cas  
30 où l'adjuvant utile au fins de la présente invention est un adjuvant de type Th1 tel que le QS-21.

L'efficacité thérapeutique ou prophylactique d'une méthode ou d'un usage selon l'invention peut être évaluée selon des méthodes standard *e.g.*, en mesurant  
35 l'induction d'une réponse immune ou l'induction d'une immunité thérapeutique ou protectrice en utilisant *e.g.*, le modèle souris / *H. felis* et les procédures décrits dans Lee et al, Eur. J. Gastroenterology & Hepatology (1995) 7 : 303 ou Lee et al, J.

Infect. Dis. (1995) 172 : 161. L'homme de l'art s'avisera que *H. felis* peut être remplacé dans le modèle souris par une autre espèce d'*Helicobacter*. Par exemple, l'efficacité d'un agent immunogène dérivé d'*H. pylori* est de préférence évalué dans un modèle souris mettant en oeuvre une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris.

5 L'efficacité peut être déterminée en comparant le degré d'infection dans le tissu gastrique (en mesurant l'activité uréase, la charge bactérienne ou l'état de la gastrite) à celui d'un groupe contrôle. Il y a effet thérapeutique ou effet protecteur lorsque l'infection est réduite par comparaison au groupe contrôle.

10 Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, elle peut être formulée avec un diluant ou un porteur acceptable d'un point de vue pharmaceutique *e.g.*, de l'eau ou une solution saline. En général, le diluant ou le porteur peut être sélectionné en fonction du mode et de la voie d'administration et selon les pratiques  
15 pharmaceutiques standard. Des porteurs ou des diluents appropriés ainsi que ce qui est indispensable à l'élaboration d'une composition pharmaceutique sont décrits dans *Remington's Pharmaceutical Sciences*, un livre de référence standard dans ce domaine.

20 Les méthodes selon l'invention ainsi que les compositions utiles à ces fins peuvent être mises en oeuvre pour traiter ou prévenir *i.a.* les infections à *Helicobacter* et par conséquent, les maladies gastroduodénales associées à ces infections, y compris les gastrites aiguës, chroniques ou atrophiques, les ulcères peptiques *e.g.*, les ulcères gastriques ou duodénaux.

25 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être administrée de manière conventionnelle notamment par voie muqueuse *e.g.*, par voie oculaire, orale *e.g.* buccale ou gastrique, pulmonaire, intestinale, rectale, vaginale ou urinaire ou par voie systémique, notamment parentérale *e.g.*, intraveineuse, intramusculaire,  
30 intradermique, intraépidermique et sous-cutanée. De préférence, on utilise la voie parentérale. Lorsque la voie parentérale est mise en oeuvre, on choisit de préférence un site d'administration situé sous le diaphragme d'un individu. La région dorso-lombaire constitue par exemple un site d'administration approprié, notamment pour les voies intraépidermiques, intramusculaire, intradermique et sous-cutanée ; ces  
35 dernières étant choisies de préférence à la voie intraveineuse.

Afin d'obtenir un effet protecteur ou thérapeutique, l'opération qui consiste à administrer une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut être répétée une ou plusieurs fois, de préférence au moins deux fois, en laissant un certain intervalle de temps entre chaque administration ; intervalle qui est de  
5 l'ordre de la semaine ou du mois. Sa détermination précise est à la portée de l'homme du métier et peut varier en fonction de divers facteurs tels que la nature de l'agent immunogène, l'âge de l'individu, etc.

Selon un mode particulier, le protocole de vaccination est mis en oeuvre en  
10 utilisant la même voie d'administration lors de la primo-immunisation et des rappels. Dans ce cas là, on parle par exemple d'administration systémique stricte.

"Une méthode dans laquelle l'administration de l'agent immunogène est mise en oeuvre par voie systémique stricte" est définie comme une méthode ne mettant  
15 pas en jeu de voie d'administration autre que la voie systémique. Par exemple, une méthode dans laquelle l'agent immunogène est administré par voie systémique et par voie muqueuse, ne répond pas à la définition énoncée ci-avant. En d'autres termes, "une méthode dans laquelle l'administration de l'agent immunogène est mise en  
20 oeuvre par voie systémique stricte" doit être comprise comme une méthode dans laquelle l'agent immunogène est administré par voie systémique à l'exclusion de toute autre voie, notamment la voie muqueuse.

A titre illustratif non-limitatif, on évoque un schéma de vaccination qui consiste à administrer l'apoenzyme de l'uréase en association avec le QS-21, le DC-  
25 chol ou un de leurs équivalents, trois fois par voie sous-cutanée, dans la région dorso-lombaire avec un intervalle de deux à quatre semaines entre chaque administration.

On peut aussi prévoir que l'administration d'une composition pharmaceutique  
30 selon la présente invention peut être une simple étape faisant partie d'un protocole de vaccination plus élaboré. Par exemple, une composition pharmaceutique selon la présente invention peut être précédée ou suivie de l'administration d'une composition pharmaceutique contenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* choisi de  
35 manière indépendante parmi ceux énoncés ci-avant ou parmi d'autres tels qu'un vecteur vaccinal ou une molécule d'ADN ; mais ne contenant pas de QS-21, de DC-chol ou un de leurs équivalents ; ceux-ci pouvant alors être remplacé par un tout

autre adjuvant ; les deux compositions pouvant être administrées par des voies identiques ou différentes.

A titre illustratif non-limitatif, on évoque les protocoles suivants :

5

- Une primo-immunisation par voie systémique, avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21, suivie de deux rappels avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21 ou de LT par voie muqueuse ; et

10

- Une primo-immunisation par voie systémique, avec un poxvirus codant pour UreA et UreB suivie de deux rappels avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21, par voie systémique ou muqueuse.

15 Des agents immunogènes autres que ceux décrits ci-avant et pouvant être utilisés dans un protocole de vaccination multi-étapes comprenant une étape d'administration mettant en jeu un médicament utile aux fins de la présente invention ou une composition selon la présente invention, peuvent être sélectionnés parmi une  
20 une molécule polynucléotidique, notamment une molécule d'ADN comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule de mammifère ;  
ou bien encore un vecteur vaccinal comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule de mammifère (si il s'agit d'un vecteur viral) ou chez un procaryote (si il s'agit d'un vecteur bactérien).

25

La molécule d'ADN peut avantageusement être un plasmide qui est incapable à la fois de se répliquer et de s'intégrer de manière substantielle dans le génome d'un mammifère. La séquence codante citée ci-dessus est placée sous le contrôle d'un promoteur permettant l'expression dans une cellule de mammifère. Ce promoteur  
30 peut être ubiquitaire ou spécifique d'un tissu. Parmi les promoteurs ubiquitaires, on cite le promoteur précoce du Cytomegalovirus (décrit dans le brevet US n° 4,168,062) et le promoteur du virus du sarcome de Rous (décrit dans Norton & Coffin, Molec. Cell. Biol. (1985) 5 : 281). Le promoteur desmine (Li et al, Gene (1989) 78 : 244443 ; Li & Paulin, J. Biol. Chem. (1993) 268 : 10403) est un  
35 promoteur sélectif permet l'expression dans les cellules musculaires et aussi dans les cellules de la peau. Un promoteur spécifique des cellules musculaires est par exemple le promoteur du gène de la myosine ou de la dystrophine. Des vecteurs

plasmidiques que l'on peut utiliser aux fins de la présente invention sont décrits *i.a.*, dans WO 94/21797 et Hartikka et al, Human Gene Therapy (1996) 7 : 1205.

5 Dans une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention, la molécule nucléotidique *e.g.* la molécule d'ADN peut être formulée ou non. Le choix de la formulation est très varié. L'ADN peut être simplement dilué dans une solution acceptable d'un point de vue physiologique avec ou sans porteur. Lorsque ce dernier est présent, il peut être isotonique ou faiblement hypertonique et avoir basse force ionique. Par exemple, ces conditions peuvent être remplies par une solution de  
10 sucrose *e.g.* à 20 %.

De manière alternative, le polynucléotide peut être associé avec des agents qui favorise l'entrée dans la cellule. Ce peut être (ii) un agent chimique qui modifie la perméabilité cellulaire, telle que la bupivacaine (voir par exemple WO 94/16737) ou  
15 (ii) un agent s'associant au polynucléotide et agissant en tant que véhicule facilitant le transport du polynucléotide. Ce dernier peut être notamment des polymères cationiques *e.g.* de la polylysine ou une polyamine *e.g.* des dérivés de la spermine (voir WO 93/18759). Ce peut être également des peptides fusogéniques *e.g.* du GALA ou de la Gramicidine S (voir WO 93/19768) ou bien encore des peptides  
20 dérivés des protéines de fusion virales.

Il peut aussi s'agir de lipides anioniques ou cationiques. Les lipides anioniques ou neutres sont connus depuis longtemps comme pouvant servir d'agents de transport, par exemple sous forme de liposomes, à un grand nombre de composés y  
25 compris les polynucléotides. Une description détaillée de ces liposomes, de leurs constituants et de leurs procédés de fabrication est par exemple fournit par Liposomes : A Practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990).

Les lipides cationiques sont aussi connus et communément utilisés comme  
30 agents de transport pour les polynucléotides. On cite par exemple la Lipofectin<sup>TM</sup> aussi connue sous le nom de DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride), le DOTAP (1,2-bis(oleoyloxy)-3-(triméthylammonio) propane), le DDAB (dimethyldioctadecylammonium bromide), le DOGS (dioctadecylamidoglycyl spermine) et les dérivés du cholestérol tel que le DC-chol  
35 (3 bêta -(N-(N',N'-diméthyl aminoethane)-carbamoyl) cholestérol). Une description de ces lipides est fournie par EP 187,702, WO 90/11092, le brevet US N° 5,283,185, WO 91/15501, WO 95/26356 et le brevet US N° 5,527,928. Les lipides cationiques

sont utilisés de préférence avec un lipide neutre tel que le DOPE (dioleyle phosphatidylethanolamine) comme par exemple cela est décrit dans WO 90/11092.

Des microparticules d'or ou de tungstène peuvent aussi être utilisées comme agents de transport, tel que c'est décrit dans WO 91/359, WO 93/17706 et Tang et al, Nature (1992) 356 : 152. Dans ce cas là, le polynucléotide est précipité sur les microparticules en présence de chlorure de calcium et de spermidine puis l'ensemble est administré par jet à haute vitesse dans le derme ou dans l'épiderme, à l'aide d'un appareil sans aiguille tel que ceux décrits dans les brevets US N° 4,945,050 et N° 5,015,580 et WO 94/24243.

La quantité d'ADN qui peut être utilisée pour vacciner un individu dépend d'un certain nombre de facteurs tels que par exemple la force du promoteur utilisé afin d'exprimer l'antigène, l'immunogénicité du produit exprimé, la condition du mammifère auquel est destinée l'administration (e.g., le poids l'âge, et l'état de santé général), le mode d'administration et le type de formulation. En général une dose appropriée à un usage prophylactique ou thérapeutique chez un adulte de l'espèce humaine est d'environ 1 µg à environ 5 mg, de préférence d'environ 10 µg à environ 1 mg, et de manière tout particulièrement préférée d'environ 25 µg à environ 500 µg.

Parmi les agents immunogènes cités précédemment, on trouve les vecteurs vaccinaux. Parmi les vecteurs d'origine virale on trouve notamment les adénovirus et les poxvirus. Un exemple de vecteur dérivé d'un adénovirus ainsi qu'une méthode pour construire un vecteur capable d'exprimer une molécule d'ADN codant pour un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention sont décrits dans le brevet US N° 4,920,209. Des poxvirus qui peuvent être utilisés de même, sont par exemple les virus de la vaccine et du canarypox. Ils sont décrits de manière respective dans les brevets US N° 4,722,848 et 5,364,773 (voir aussi e.g., Tartaglia et al, Virology (1992) 188 : 217 et Taylor et al, Vaccine (1995) 13 : 539). Des poxvirus capable d'exprimer un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention peuvent être obtenus par recombinaison homologue tel que décrit dans Kieny et al, Nature (1984) 312 : 163, de manière à ce que le fragment d'ADN codant pour le peptide ou le polypeptide soit placé dans des conditions appropriées à son expression dans des cellules de mammifères. Un vecteur bactérien tel que le Bacille bilié de Calmette-Guérin peut être aussi envisagé.

D'une manière générale, la dose d'un vecteur viral destinée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques peut être d'environ  $1 \times 10^4$  à environ  $1 \times 10^{11}$ , de manière avantageuse d'environ  $1 \times 10^7$  à environ  $1 \times 10^{10}$ , de préférence d'environ  $1 \times 10^7$  à environ  $1 \times 10^9$  unités formant plaques *per* kilogram.

5

Parmi les vecteurs bactériens, on cite notamment *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Des souches mutantes non-toxiques de *Vibrio cholerae* qui peuvent être utiles comme vaccin vivant, sont décrites dans Mekalanos et al, Nature (1983) 306 : 551 et le brevet US N° 4,882,278 (souche dans laquelle une partie substantielle de la région codant pour chacun des deux allèles *ctxA* a été déléetée de manière à ce qu'aucune toxine fonctionnelle ne puisse être produite) ; WO 92/11354 ( souche dans laquelle le locus *irgA* est inactivé par mutation ; cette mutation peut être combinée dans une même souche avec des mutations *ctxA*) ; at WO 94/1533 (mutant obtenu par délétion à qui il manque des séquences fonctionnelles *ctxA* et *attRS1*). Ces souches peuvent être modifiées génétiquement afin d'exprimer des antigènes hétérologues tel que décrit dans WO 94/19482.

Des souches atténuées de *Salmonella typhimurium* modifiées génétiquement ou non pour l'expression recombinante d'antigènes hétérologues, ainsi que leurs usage en tant que vaccins sont décrits dans Nakayama et al, BioTechnology (1988) 6 : 693 et WO 92/11361.

D'autres bactéries utiles en tant que vecteurs vaccinaux sont décrits dans High et al, EMBO (1992) 11 : 1991 et Sizemore et al, Science (1995) 270 : 299 (*Shigella flexneri*) ; Medaglini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92 : 6868 (*Streptococcus gordonii*) ; et Flynn J.L. Cell. Mol. Biol. (1994) 40 (suppl. I) : 31, WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796 et WO 92/21376 (Bacille de Calmette Guérin).

30

Dans les vecteurs bactériens la séquence d'ADN codant pour un peptide ou polypeptide d'*Helicobacter* peut être insérée dans le génome bactérien ou bien rester à l'état libre, portée par un plasmide.

De même une molécule d'ADN ou un vecteur vaccinal peuvent comporter une séquence codant pour n'importe quel polypeptide ou peptide décrit ci-dessus.

35



Une molécule d'ADN, de préférence un vecteur vaccinal viral peut aussi comporter une séquence codant pour une cytokine, par exemple une lymphokine telle que l'interleukine-2 ou -12, sous le contrôle d'éléments appropriés pour expression dans une cellule de mammifère. Une alternative à cette option consiste aussi à ajouter  
5 dans une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention comprenant une molécule d'ADN ou un vecteur, une autre molécule ou vecteur viral codant pour une cytokine.

D'une manière générale, l'invention a donc également pour objet une  
10 composition pharmaceutique destinée à traiter ou à prévenir une infection à *Helicobacter* qui comprend pour administration consécutive : (i) un premier produit contenant (a) un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* sélectionné de manière indépendante, parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme  
15 purifiée, et (b) un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type Th1 et (ii) un deuxième produit contenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* sélectionné de manière indépendante, parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée, une molécule d'ADN comportant  
20 une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et un vecteur vaccinal comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression ; de préférence à condition que, lorsqu'un premier produit contient un peptide ou un polypeptide et un  
25 deuxième produit contient une molécule d'ADN ou un vecteur vaccinal, ladite séquence codante de la molécule d'ADN ou du vecteur vaccinal code pour le peptide ou polypeptide contenu dans le premier produit.

Dans la description ci-avant on s'est essentiellement référé aux infections à  
30 *Helicobacter* et aux moyens de les combattre en prévention et en prophylaxie. Néanmoins, on doit comprendre que les principes et méthodes énoncés ci-avant peuvent s'appliquer *mutatis mutandis* à toute autre infection induite par un microorganisme quelconque dont le siège est l'estomac le duodénum ou l'intestin.

35 On précise en outre que tous les documents publiés et cités dans la présente demande sont incorporés par référence.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

La Figure 1 se réfère à l'Exemple 1 et présente les niveaux d'activité uréase après épreuve, mesurée 4 hrs après le sacrifice des souris ayant reçues par 3 fois, à J0, J28 et J56 : (a) une préparation d'uréase encapsulée à environ 80 % dans des liposomes DC-chol, dans les muscles dorso-lombaires ; ou (b) une préparation d'uréase adjuvantée par de la toxine cholérique, par voie intragastrique. Les expériences (c) et (d) correspondent respectivement aux témoins positifs et négatifs.

La Figure 2 se réfère à l'Exemple 1 et présente les niveaux d'activité uréase après épreuve, mesurée 4 hrs après le sacrifice des souris ayant reçues par 3 fois, à J0, J28 et J56 : (a) une préparation d'uréase adjuvantée par de la toxine cholérique, par voie intragastrique ou (b) une préparation d'uréase adjuvantée par du PCPP, par voie sous-cutanée dans la partie sous-lombaire postérieure gauche ; ou (c) une préparation d'uréase adjuvantée par du QS-21, par voie sous-cutanée dans le bas du dos. Les expériences (c) et (d) correspondent respectivement aux témoins positifs et négatifs.

La Figure 3 présente les quantités d'immunoglobulines sériques induites chez les singes soumis à des protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 2, et exprimées en titre ELISA. Un groupe contrôle comprenant 4 singes et trois groupes test sont formés, chacun des groupes test comprenant 8 singes ; chaque groupe test est divisé en deux sous-groupes de 4 singes, l'un recevant uniquement la préparation *H. pylori* inactivée (1, 2 et 3) et l'autre recevant la préparation *H. pylori* inactivée et de l'uréase recombinante (1u, 2u et 3u). Le groupe 1 et 1u correspond au protocole d'administration [nasal + intragastrique, 4 fois] ; le groupe 2 et 2u correspond au protocole d'administration [intramusculaire, 4 fois] ; le groupe 3 et 3u correspond au protocole d'administration [nasal + intragastrique, intramusculaire, nasal + intragastrique, intramusculaire]. Le titre ELISA est mesuré trois fois : une première fois, à J0 (bande blanche), une deuxième fois à J42 (bande grise), une troisième fois à J78 (bande noire).

La Figure 4 présente les quantités d'immunoglobulines sériques induites chez les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, et exprimées en titre ELISA. ○ indique le titre ELISA en IgG2a et ◆ indique le titre ELISA en IgG1. Deux groupes contrôle (témoins positif et négatif), quatre groupes test (A1 à A4) ainsi qu'un groupe de référence (LT) sont formés ; chacun des groupes

comprenant 10 souris. Les mesures des quantités d'immunoglobulines sériques sont effectuées pour seulement 5 souris parmi les dix. Les souris des groupes A1 à A4 ont reçues des doses de 10 µg d'uréase par voie sous cutanée dans la partie sous-lombaire postérieure gauche, en présence de QS-21 (A1), Bay R1005 (A2), DC-chol (A3) ou de PCPP (A4). Les souris du groupe de référence ont reçues des doses de 40 µg d'uréase par voie orale en présence de la protéine heat-labile d'*E. coli*.

La Figure 5 présente les taux d'activité uréase mesurés au niveau de la muqueuse stomacale, à DO<sub>550</sub> 4 heures après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.

La Figure 6 présente les taux d'activité uréase mesurés au niveau de la muqueuse stomacale, à DO<sub>550</sub> 24 heures après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.

La Figure 7 présente la charge bactérienne mesurée au niveau de la muqueuse stomacale, après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.

Les Figures 8A et 8B présentent l'activité uréase (Fig. 6A) évaluée après 4 hrs (OD à 550 nm) avec le Jatrox test (Procter & Gamble) et la charge bactérienne (Fig. 6B) chez des souris infectées par *H. pylori* et ensuite soumises à différents traitements A-H [A : LT + uréase par voie orale ; B : QS21 + uréase, par voie parentérale, au niveau du cou ; C : QS21 + uréase, par voie parentérale, dans la région lombaire ; D : QS21 seul par voie sous-cutanée, dans la région lombaire ; E : Bay R1005 + uréase, par voie parentérale, au niveau du cou ; F : Bay R1005 + uréase par voie parentérale, dans la région lombaire ; G : Bay R1005 seul, par voie sous-cutanée dans la région lombaire (contrôle) ; H : solution saline par voie sous-cutanée dans la région lombaire (contrôle positif)] I représente le contrôle négatif.

## Exemple 1 : Etudes d'immunisation chez la souris

### 1A - Matériel et méthodes

#### 5 Souris

Des souris femelles Swiss de 6/8 semaines ont été fournies par Janvier (France). Pendant toute la durée de l'expérience on a utilisé du matériel stérilisé ; les cages étaient protégées par des "isocaps" ; les souris ont été nourries avec de l'eau filtrée et des aliments irradiés.

10

#### Protocole d'administration

Lors de chaque expérience, les souris ont reçues 3 doses du même produit ; chaque dose à 28 jours d'intervalle (les jours 0, 28 et 56). L'administration du produit a été effectuée par voie nasale (jusqu'à 50 µl sur les souris éveillées), par voie orale (300 µl en 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> par gavage gastrique), ou par voie sous-cutanée (300 µl sous la peau du cou ou sous la peau du côté gauche de la région lombaire). Dans certains cas, une inoculation intramusculaire a été effectuée (50 µl) dans les muscles dorso-lombaires des souris anesthésiées. 10 µg d'uréase ont été administrés par voie nasale, sous cutanée ou intramusculaire, et 40 µg par voie orale. En ce qui concerne la préparation bactérienne inactivée, 400 µg de cellules ont été administrés par voie sous cutanée ou par voie orale.

20

#### Antigènes et adjuvants

25 L'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée comme cela a été décrit dans l'exemple 5 de WO96/31235. Dans la suite du texte pour désigner cette apoenzyme, on emploie le simple terme d'uréase.

Des liposomes DC-chol contenant de l'uréase sont préparés comme suit : Tout d'abord, afin d'obtenir un film lipidique sec contenant 100 mg de DC-chol (R-Gene Therapeutics) et 100 mg de DOPC (dioleylphosphatidylcholine) (Avanti Polar Lipids), on mélange ces produits sous forme de poudre dans environ 5 ml de chloroforme. On laisse la solution s'évaporer sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le film ainsi obtenu sur les parois du récipient est séché sous vide poussé pendant au moins 4 hrs. En parallèle, 20 mg d'un lyophilisat d'uréase et 100 mg de sucrose sont dilués dans 13.33 ml de tampon Hepes 20 mM pH 7.2. Dix ml de cette préparation (qui contient 1.5 mg d'uréase et 0.75 % de sucrose) est filtrée sur filtre

30

35

Millex 0.220  $\mu\text{m}$ , puis utilisée pour réhydrater le film lipidique. La suspension est mise sous agitation pendant 4 hrs puis soit extrudée (10 passages sur membrane de polycarbonate 0.2  $\mu\text{m}$ ) ou microfluidisée (10 passages sous une pression de 500 kPa dans un microfluidiseur Y10 de Microfluidics Co). Dans la suspension de liposomes  
5 ainsi obtenue le taux d'uréase encapsulée est de 10 à 60 %. Cette suspension est lyophilisée après avoir ajusté la concentration en sucrose à 5 % (on ajoute 425 mg de sucrose pour 10 ml). Avant utilisation, le lyophilisat est repris par un volume d'eau ou de tampon approprié et la suspension est purifiée sur un gradient discontinu de sucrose (paliers de 0, 30 et 60 %) de manière à obtenir une préparation dans laquelle  
10 la quantité d'uréase encapsulée est supérieure à 70 % environ par rapport à la quantité totale d'uréase.

La toxine cholérique est utilisée comme adjuvant mucosal à raison de 10  $\mu\text{g}$  / dose d'uréase ou de préparation bactérienne.

15

Le QS-21 (Cambridge Biosciences) est utilisé comme adjuvant à raison de 15  $\mu\text{g}$  / dose d'uréase.

Le polyphosphazène (PCPP) (Virus Research Institute) est utilisé comme adjuvant à  
20 raison de 100  $\mu\text{g}$  / dose d'uréase.

### Epreuve

Deux semaines après le deuxième rappel, les souris ont été soumises à un gavage gastrique avec 300  $\mu\text{l}$  d'une suspension d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris,  
25 la souche ORV2002 ( $1 \times 10^7$  bactéries vivantes dans 200  $\mu\text{l}$  de PBS ;  $\text{DO}_{550}$  de 0.5 environ). Un groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même.

### Analyse de l'épreuve

30 Quatre semaines après l'épreuve, les souris ont été sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales. Les estomacs ont été prélevés pour évaluer l'activité uréase et faire des analyses histologiques. L'activité uréase a été évaluée après 4 et 24 heures ( $\text{DO}$  à 550 nm) avec le Jatrox test, Procter & Gamble) et après 24 heures le nombre de souris encore négatives ( $\text{DO}$  inférieure à 0,1) a été relevé.

### Mesure de réponse anticorps locale par ELISPOT (glandes salivaires et estomac).

Les ELISPOT ont été exécutés conformément à Mega et al, J. Immunol. (1992) 148 :  
5 2030. Les plaques ont été enduites d'un extrait de protéines d'*H. pylori* à une concentration de 50 µg/ml.

Pour tester la réponse anticorps au niveau de l'estomac nous avons modifié la méthode comme suit : La moitié de l'estomac a été coupée en morceau de 1mm<sup>2</sup> avec  
10 un appareil automatique pour couper les tissus humains (Mc Illwain Laboratories, Gilford, UK) et la digestion effectuée avec de la Dispase (2 mg/ml, Boeringher Mannheim) dans 2 ml d'une solution de Joklil modifiée à laquelle ont été ajoutés  
15 10 % de sérum de cheval (Gibco), de la glutamine et des antibiotiques. Quatre digestions d'une 1/2 heure ont été exécutées à 37° C avec brassage doux. Les cellules ainsi digérées ont été filtrées après chaque étape à l'aide de filtres 70 µm (Falcon), puis lavées 3 fois dans une solution de RPMI 1640 (Gibco) complémentée à 5 % de  
20 de sérum de veau foetal (FCS), et incubées dans la même solution pendant au moins 4 heures dans des plaques recouvertes de nitrocellulose (Millipore) (100 µl/puits, 4 puits). Par moitié d'estomac, on obtient entre 1 et 3,10<sup>5</sup> cellules (les cellules de grande taille et les macrophages n'ont pas été comptées).

L'IgA biotinylée et le complexe streptavidine - peroxydase biotinylée provenaient d'Amersham. Les spots ont été révélés sous l'action du substrat AEC (Sigma) et dès  
25 que les plaques sont sèches, ils ont été comptés sous un microscope (grossissement 16 ou 40X). Les valeurs moyennes correspondant au nombre de taches (spots) d'IgA dans quatre puits ont été calculées et exprimées comme le nombre de taches/10<sup>6</sup> cellules.

### Analyse de la réponse par ELISA

30 Les analyses par ELISA ont été exécutées conformément au protocole standard (les conjugués biotinylés et la streptavidine peroxydase provenaient de chez Amersham et le substrat OPD (O-phenyldiamine dihydrochloride) de chez Sigma). Les plaques étaient enduites d'extraits *H. pylori* (5µg/ml) dans du tampon carbonate. Un sérum de contrôle de souris dirigé contre l'extrait d'*H. pylori* a été introduit dans chaque  
35 expérience. Le titre correspond à l'inverse de la dilution donnant une DO de 1,5 à 490 nm.

## 1B - Résultats

Les résultats sont présentés dans les Figures 1 et 2 décrites ci-avant et commentées comme suit :

5

Avant tout commentaires au sujet des Figures 1 et 2, on note que ces figures présentent les résultats obtenus avec l'antigène utilisé adjuvanté par de la toxine cholérique et administré par voie intragastrique. Cette expérience est dite expérience de référence standard dans la mesure où l'association de l'art antérieur CT / IG est celle qui donne les meilleurs résultats à ce jour.

10

La Figure 1 montre qu'une préparation d'uréase encapsulée dans des liposomes DC-chol donne d'aussi bons résultats que ceux obtenus dans l'expérience de référence standard. } ok

15

De plus, on fait référence aux expériences (a) à (d) dont les résultats en termes d'activité uréase 4 hrs après que les souris aient été sacrifiées sont reportés dans la Figure 1 et on indique que le nombre de souris qui sont toujours négatives pour l'activité uréase 24 hrs après avoir été sacrifiées est respectivement (a) 5/10, (b) 4/10, (c) 0/10 et (d) 10/10. Ceci est en accord avec ce qui a été conclu au paragraphe précédemment ; à savoir que l'expérience (a) conduit à des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'expérience de référence standard.

20

25

La Figure 2 montre qu'une préparation d'uréase adjuvantée par le QS-21 donne d'aussi bons résultats que ceux obtenus dans l'expérience de référence standard. De plus, cette figure montre que les résultats que l'on obtient en utilisant le PCPP à titre d'adjuvant sont beaucoup moins bons que ceux obtenus avec le QS-21. Ceci s'explique dans la mesure où le PCPP induit préférentiellement avec l'uréase une réponse de type Th2 tandis que le QS-21 avec l'uréase induit une réponse équilibrée Th1/Th2 ; ainsi que cela est démontré dans le tableau ci après.

30

35

De plus, on fait référence aux expériences (a) à (e) dont les résultats en termes d'activité uréase 4 hrs après que les souris aient été sacrifiées sont reportés dans la Figure 2 et on indique que le nombre de souris qui sont toujours négatives pour l'activité uréase 24 hrs après avoir été sacrifiées est respectivement (a) 1/8, (b) 0/8, (c) 5/8, (d) 0/8 et (e) 10/10. Ceci est en accord avec ce qui a été conclu au paragraphe

précédemment ; à savoir que l'expérience (c) conduit à des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'expérience de référence standard.

Le tableau ci-après présente les quantités d'IgA, IgG1 et IgG2a sériques induites lors des expériences dont les résultats en termes d'activité uréase sont reportés dans les Figures 1 et 2 ainsi que le nombre de souris dont l'activité uréase est caractérisée par une DO inférieure à 0.1 après 4 et 24 hrs après sacrifice. Les quantités d'IgA, IgG1 et IgG2a sont exprimées en titre ELISA.

	urease CT IG	urease DC-chol SC	uréase PCPP SC	urease QS21 SC
IgA	45	0	58	1
IgG1	65700	620000	2930520	2970399
IgG2a	20200	321000	26200	1136095
DO < 0.1 4 hrs	5/10	5/10	0/8	6/8
DO < 0.1 24 hrs	4/10	5/10	0/8	5/8

Les résultats présentés dans le tableau ci-avant montrent que lorsque la voie sous-cutanée est employée (ainsi qu'un adjuvant approprié pour cette voie), le taux d'anticorps sérique est important ; ce qui n'est pas le cas après usage de la voie intragastrique (et de l'adjuvant qui est approprié à cette voie). De plus, ces résultats montrent que lorsque l'on utilise le DC-chol ou le QS-21, on obtient un fort taux d'IgG2a, comparable au taux d'IgG1 en ordre de grandeur. Ceci indique que ces adjuvants ont la capacité d'induire non seulement une réponse Th2, mais aussi une réponse Th1. Par contre, lorsque l'on utilise le PCPP, le taux d'IgG2a obtenu est nettement plus faible que le taux d'IgG1. On en conclut que ce dernier adjuvant induit essentiellement une réponse Th2 et ne peut donc pas être un adjuvant utile aux fins de la présente invention.



## Exemple 2 : Etudes d'immunisation chez les singes

### 2A - Matériel et méthodes

#### 5 Singes

Vingt huit singes (*Macaca fascicularis*) âgés de 2 ans et originaires de l'île Maurice ont été utilisés dans cette étude. Avant de soumettre les singes aux différents protocoles d'immunisation décrits ci-après, une biopsie a révélé que la plupart d'entre eux étaient infectés de manière chronique par des organismes proches de *Gastrospirillum hominis* (GHLO) ou de *H. heilmanii*.

#### Protocoles d'administration

Puisque presque tous les singes étaient infectés par des GHLO, on a décidé de tester l'efficacité de différents protocoles en thérapie. Trois protocoles ont été mis en oeuvre, tels que résumés dans le tableau ci après :

Groupe	J0	J21	J42	J63
1 et 1u	IN + IG	IN + IG	IN + IG	IN + IG
2 et 2u	IM	IM	IM	IM
3 et 3u	IM	IN + IG	IM	IN + IG

On précise que l'administration par voie intramusculaire a été effectuée dans les muscles dorso-lombaires.

#### Antigènes et adjuvants

Dans la mesure où il existe une réactivité croisée entre les GPLO et *H. pylori*, on a choisit d'utiliser une préparation de bactéries *H. pylori* inactivées, telle que décrite dans l'exemple 1A, seule ou en combinaison avec de l'uréase recombinante préparée selon la méthode référencée dans l'exemple 1A.

La heat-labile toxine d'*E. coli* (LT) (Sigma) ou la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) (Pasteur Mérieux sérums & vaccins) a été utilisé comme adjuvant mucosal tandis que le DC-chol a été utilisé comme adjuvant parentéral. De la poudre de DC-chol est simplement réhydratée par une préparation d'antigène.

Les doses utilisées sont comme suit :

Voie	Germes	Urease	DC-chol	LT	CTB
IG	400 µg	2,5 mg	-	25 µg	-
IN	400 µg	400 µg	-	25 ng	25 µg
IM	400 µg	100 µg	400 µg	-	-

#### Biopsies, test uréase et étude bactériologique / histologique

- 5 On a effectué une biopsie sur chacun des singes avant et après immunisation (un mois après le troisième rappel). A partir des biopsies, un test uréase et une étude histologique ont été mis en oeuvre.

L'activité uréase est évaluée en utilisant le kit Jatrox (Procter & Gamble).

- 10 L'importance de cette activité est estimée comme suit, de manière décroissante : niveau 3, coloration rose apparaissant au cours des 10 premières minutes ; niveau 2, coloration rose apparaissant entre 10 et 30 minutes après l'adjonction des réactifs ; niveau 1, coloration rose apparaissant entre 30 min et 4 hrs et niveau 0, coloration faible ou inexistante après 4 hrs.

15

Les études histologiques ont été réalisées à partir de biopsies fixées dans du formol et la charge bactérienne quantifiée comme suit : absence de bactéries (0) ; quelques bactéries de type *Helicobacter* (0,5) ; d'assez nombreuses bactéries (1) ; de nombreuses bactéries (2) ; de très nombreuses bactéries (3). Une différence d'un

20 niveau (de 1 à 2 par exemple) correspond à un nombre 5 fois plus important de bactéries.

#### Analyse de la réponse par test ELISA

Un test ELISA est mis en oeuvre comme décrit dans l'exemple 1A.

25

#### 2B - Résultats

- Le tableau ci-dessous est relatif à la charge bactérienne qui, avant et après immunisation, est appréciée à l'aide de deux tests : (i) en évaluant l'activité uréase et
- 30 (ii) en effectuant une étude histologique. Les résultats y afférant sont présentés dans les colonnes 3 à 6. Les trois dernières colonnes indiquent pour chaque groupes (contrôle, 1, 2 ou 3) le nombre de singes pour lesquels la charge bactérienne reste

inchangée après immunisation (→) d'après les deux tests ; ou apparaît moindre (↘) ou accrue (↗) dans au moins un des deux tests, l'autre test indiquant une charge bactérienne stationnaire. Lorsque les résultats des deux tests vont dans le même sens, la flèche ascendante ou descendante est double.

5

Singes	Groupe	Activité Urease		Histologie		Variation		
		avant immunisation	après immunisation	avant immunisation	après immunisation	↘	→	↗
H 282	C	2-2	3-2	2	3-2			
J 005	C	2-2	2-1	2	1-0	1/4	1/4	2/4
J 852	C	0-0	2-0	0	1-1			(2/4 ↗↗)
J 476	C	0-0	2-0	0	1-1			
H 799	l	2-2	2-2	2	2-2			
J 845	l	2-2	3-2	2	2-1			
J 205	l	1-1	2-2	0	1			
J 328	l	2-2	1-2	3	3-2	1/8	5/8	2/8
J 197	lu	2-2	3-2	2	3			(1/8 ↗↗)
H 025	lu	2-2	2-2	1	1-1			
G 460	lu	2-2	3-2	3	2-3			
J 607	lu	2-2	2-2	2	2			
H 549	2	3-3	2-2	3	2-3			
H 622	2	3-3	1-1	2	2-3			
H 504	2	3-3	1-1	2	2-1			
H 798	2	1-1	0-1	1	1-1			
J 367	2u	2-2	2-1	3	2-3	6/8	1/8	1/8
G 486	2u	2-2	2-2	1	2-2			
J 522	2u	2-2	0-0	2	2-2			
G 722	2u	3-3	2-0	2	2-3			
H 820	3	3-3	2-2	3	2-2			
J 557	3	2-2	1-0	2	1-2*			
H 588	3	2-2	2-0	3	1-2			
J 153	3	3-3	3-3	2	3-3	5/8	0	3/8
H 480	3u	2-2	2-2	2	3-3	(3/8 ↘↘)		
J 344	3u	3-3	2-0	3	2-2			
H 710	3u	2-2	2-2	2	3-3			
J 262	3u	3-3	2-2	3	3-2			

Ainsi, ce tableau révèle que dans le groupe ayant été soumis à un protocole d'immunisation par la voie muqueuse stricte, les résultats sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec le groupe contrôle négatif. Par contre, dans les  
5 groupes ayant été soumis à un protocole d'immunisation par voie mixte muqueuse et intramusculaire ou par la voie intramusculaire stricte, on observe une nette réduction de la charge bactérienne. Ceci met en lumière l'importance des conditions d'immunisation et en particulier de l'adjuvant utilisé ; et en conséquence, on recommande l'usage d'un adjuvant tel que le DC-chol, capable de favoriser une  
10 réponse Th1 et Th2 équilibrée, afin d'obtenir un effet protecteur.

Ces résultats sont à mettre en perspective avec d'autres résultats relatifs aux taux d'anticorps sériques qui sont présentés dans la Figure 3. Cette figure montre que le schéma d'immunisation par voie muqueuse stricte (1 et 1u) conduit à des résultats  
15 très similaires à ceux du groupe contrôle négatif. Par contre, le schéma d'immunisation par voie mixte muqueuse et intramusculaire (2 et 2u) et mieux encore le schéma d'immunisation par voie intramusculaire stricte (3 et 3u), permet d'induire des taux d'anticorps nettement supérieurs à ceux du groupe contrôle.

20 Ainsi, une réponse sérique importante peut être corrélée à un effet protecteur, tandis qu'*a contrario*, une faible réponse est liée à l'absence d'effet protecteur. Les conditions d'immunisation permettant d'obtenir l'effet désiré (réponse sérique importante et effet protecteur) inclut l'usage de la voie parentérale ciblée dans la région sous-diaphragmatique ou celui d'un adjuvant Th1.

25

### Exemple 3 : Autres études d'immunisation chez la souris

#### 3A - Matériel et méthodes

##### 30 Souris

Des souris femelles Swiss de 6/8 semaines ont été fournies par Janvier (France). Pendant toute la durée de l'expérience on a utilisé du matériel stérilisé ; les cages étaient protégées par des "isocaps" ; les souris ont été nourries avec de l'eau filtrée et des aliments irradiés.

35

**Protocole d'administration**

- Lors de chaque expérience, les souris ont reçues 3 doses du même produit ; chaque dose à 21 jours d'intervalle (les jours 0, 21 et 42). L'administration du produit a été effectuée par voie orale (300 µl en 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> par gavage gastrique), ou par
- 5 voie sous-cutanée (300 µl sous la peau du côté gauche de la région lombaire). Dix µg d'uréase ont été administrés sous cutanée et 40 µg par voie orale.

**Antigènes et adjuvants**

- 10 L'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée comme cela a été décrit dans l'exemple 5 de WO96/31235. Dans la suite du texte pour désigner cette apoenzyme, on emploie le simple terme d'uréase.

- La heat-labile toxine d'*E. coli* (Sigma) est utilisée comme adjuvant mucosal à raison
- 15 de 1 µg / dose d'uréase.

Le QS-21 (Cambridge Biosciences) est utilisé comme adjuvant à raison de 15 µg / dose d'uréase.

- 20 Le Bay R1005 (Bayer) est utilisé comme adjuvant à raison de 400 µg / dose d'uréase.

Le DC-chol (R-Gene Therapeutics) est utilisé comme adjuvant à raison de 65 µg / dose d'uréase.

- 25 Le polyphosphazène (PCPP) (Virus Research Institute) est utilisé comme adjuvant à raison de 100 µg / dose d'uréase.

**Epreuve**

- Quatre semaines après le deuxième rappel, les souris ont été soumises à un gavage
- 30 gastrique avec 300 µl (3 x 10<sup>6</sup> bactéries vivantes) d'une suspension d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris et résistante à la Streptomycine, la souche ORV2001. Un groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même.

- La suspension d'épreuve est préparée comme suit : *H. pylori* est cultivée sur agar
- 35 Muller-Hinton (Difco) contenant 5 % de sang de mouton (bioMérieux) (milieu MHA) qui contient les antibiotiques suivants de chez Sigma : Triméthoprim 5 µg/ml, Vancomycine 10 µg/ml, Polymixine B 1.3 µg/ml, Amphotéricine 5 µg/ml et

- Streptomycine 50 µg/ml. Les boîtes de culture sont incubées pendant 3 jours à 37°C dans des conditions de microaérophilie (Anaerocult C, Merck). Cette culture est récoltée pour ensemer un flacon pourvu d'évents de 75 cm<sup>2</sup> (Costar) contenant 50 ml de Brucella broth complété par 5 % de sérum de veau foetal et par les antibiotiques sus-nommés. Le flacon est incubé dans des conditions de microaérophilie, sous agitation douce pendant 24 heures. La suspension est alors diluée en Brucella broth pour donner une DO de 0,1 à 550 nm (soit 10<sup>7</sup> CFU/ml).

#### Analyse de l'épreuve

- Quatre semaines après l'épreuve, les souris ont été sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales. Les estomacs ont été prélevés pour évaluer l'activité uréase et la charge bactérienne par culture quantitative. Un quart longitudinal de l'estomac (antrum + corpus) est utilisé pour chacun des tests. L'activité uréase a été évaluée après 4 et 24 heures (DO à 550 nm) avec le Jatrox test, Procter & Gamble) et après 24 heures le nombre de souris encore négatives (DO inférieure à 0,1) a été relevé.

#### Evaluation de l'infection par culture quantitative d'*H. pylori*

- Au moment où les souris sont sacrifiées, la muqueuse d'un quart de l'estomac de chaque souris est disposée dans le milieu Portagem de bioMérieux puis dans les deux heures qui suivent, transférée en chambre de culture. L'échantillon est alors homogénéisé en utilisant un homogénéisateur de Dounce (Wheaton, Millville USA) contenant 1 ml de milieu Brucella (Brucella broth) et dilué en série jusqu'à 10<sup>-3</sup>. Cent µl de chaque dilution (10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-3</sup>) sont répandus dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MHA supplémenté par les antibiotiques sus-nommés, pour culture à 37°C dans des conditions de microaérophilie pendant 4 ou 5 jours. On décompte alors le nombre de bactéries viables. *H. pylori* est identifiée par sa morphologie révélée par une coloration de Gram et par des réactions positives à des tests uréase, catalase et oxidase.

#### Analyse de la réponse par ELISA

- Les analyses par ELISA ont été exécutées conformément au protocole standard (les conjugués biotinylés et la streptavidine peroxydase provenaient de chez Amersham et le substrat OPD de chez Sigma). Les plaques étaient enduites d'extraits *H. pylori* (5µg/ml) dans du tampon carbonate. Un sérum de contrôle de souris dirigé contre l'extrait d'*H. pylori* a été introduit dans chaque expérience. Le titre correspond à l'inverse de la dilution donnant une DO de 1,5 à 490 nm.

### 3B - Résultats

Avant tout commentaires au sujet des Figures 4 à 7, on note que ces figures présentent les résultats obtenus avec l'antigène utilisé adjuvanté par de la LT et administré par voie intragastrique. Cette expérience est dite expérience de référence standard dans la mesure où l'association de l'art antérieur LT / IG est celle qui donne les meilleurs résultats à ce jour.

#### Réponse sérique

Comme montré dans la Figure 4, après trois immunisations, toutes les souris immunisées par voie sous-cutanée présentent une réponse sérique importante en IgG. Sur la base des rapports IgG1:IgG2a, on remarque que le PCPP induit une réponse prédominante de type Th2 (fort taux IgG1, faible taux IgG2a). Le Bay R1005 et le DC-chol induisent une réponse plus équilibrée de type Th1 / Th2. Enfin le QS-21 induit une réponse prédominante de type Th1. En fait, la différence principale entre les quatre groupes de souris A1 à A4 réside dans leurs titres IgG2a, les titres IgG1 étant tous similaires.

#### Protection après épreuve

Les Figures 5 à 7 montrent que le niveau de protection dans les groupes A1 et A2 est similaire à ou même meilleur que celui observé dans le groupe de référence (LT). Il s'agit des groupes ayant reçues les doses d'uréase en présence du QS-21 et du Bay R1005 respectivement. Le groupe A3 (DC-chol) présente un niveau de protection légèrement moindre. Par contre, dans le groupe A4 (PCPP), il n'est pas possible de mettre en évidence un effet protecteur important. On note que les résultats présentés dans les Figures 5 à 7 sont consistents entre eux.

Lorsque l'on met en parallèle les résultats présentés dans la Figure 4 d'une part et les Figures 5 à 7 d'autre part, on est en droit de conclure que l'usage d'un adjuvant capable d'induire une réponse Th1 ou Th1 / Th2 (QS-21, Bay R1005 ou DC-chol) favorise la mise en place d'un effet protecteur ; contrairement à l'usage d'un adjuvant de type Th2 (PCPP).

#### Exemple 4 : Traitement d'une infection à *H. pylori* chez la souris

Nous avons comparé l'efficacité de l'immunisation par voie sous-cutanée (SC) par rapport à la voie mucosale afin de soigner une infection à *H. pylori* dans un modèle de souris.

Des souris OF1 ont été infectées avec  $10^6$  colonies formant plaques (cfu) de la souche d'*H. pylori* ORV2001. Après un mois, on a vérifié que l'infection était bien établie en sacrifiant au hasard 10/100 souris et en testant l'activité uréase sur un quart de la totalité de l'estomac. Les résultats étant tous positifs, nous avons alors immunisé des souris (10 par groupe) 3 fois à 3 semaines d'intervalle, soit par voie sous-cutanée en utilisant 10 µg d'uréase recombinante adjuvée avec 15 µg de QS21 (Aquila) ou 400 µg d'adjuvant Bay R1005 (Bayer), soit par voie orale en utilisant 40 µg d'uréase mélangée à 1 µg de LT. Pour chacun des deux adjuvants administrés par voie parentérale, l'immunisation a été réalisée soit dans le cou, afin d'atteindre les ganglions lymphatiques de la région supérieure du corps, soit dans la région lombaire afin d'atteindre les ganglions lymphatiques abdominaux. Dix souris ont été laissées non-infectées et non-immunisées (contrôle négatif), alors que les souris du groupe contrôle positif ont reçu une solution saline, du QS21 ou de l'adjuvant Bay par voie sous-cutanée (région lombaire).

Un mois après la troisième immunisation, toutes les souris ont été sacrifiées et les estomacs prélevés afin d'évaluer l'étendue de la colonisation en mesurant l'activité de l'uréase (10/10 souris furent analysées dans chaque groupe) ainsi qu'en effectuant une culture quantitative (5/10 souris furent analysées). Les Figures 6A (test portant sur l'uréase) et 6B (culture) montrent que chez les souris immunisées avec l'uréase adjuvée avec du QS21 par voie sous-cutanée dans la région lombaire, l'infection avait quasiment disparu (4/5 souris étaient négatives en culture quantitative). Les souris immunisées avec l'uréase par voie sous-cutanée dans le cou, en présence de QS21 et les souris recevant l'uréase plus de la LT par voie orale présentaient une diminution de l'infection de 10 à 100 par rapport aux souris non-immunisées. L'adjuvant Bay avait induit une diminution identique, plus prononcée chez les souris immunisées dans la région lombaire.

La réalisation d'une histopathologie sur ces mêmes souris n'a pas révélé de gastrite plus importante par rapport aux contrôles.



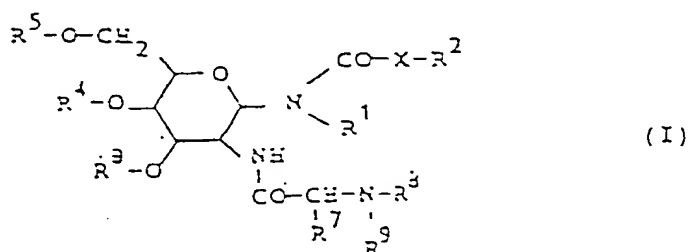
Comme nous l'avions observé dans notre précédente étude prophylactique (Exemple 1), les souris protégées présentaient un taux sérique élevé des deux isotypes IgG1 et IgG2, ce qui est représentatif d'une réponse équilibrée Th2/Th1. De plus, les souris immunisées par voie sous-cutanée dans la région lombaire présentaient les plus hauts  
5 niveaux sériques en IgA, ce qui démontre une réponse mucosale.

Ces résultats indiquent que l'immunisation systémique ciblée est capable de guérir une infection à *H. pylori* acquise chez une souris, et que l'utilisation d'adjuvants induisant une réponse mucosale équilibrée de type Th1/Th2 est souhaitable afin  
10 d'atteindre ce but.

### Revendications

1. Une composition pharmaceutique qui comprend un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et au moins un composé sélectionné parmi :

- (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;
- (ii) des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; à condition que ces lipides ne soient pas présentés sous forme de liposomes lorsque ladite composition ne contient pas de saponine ni de glycolipopeptide de formule (I) ; et
- (iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



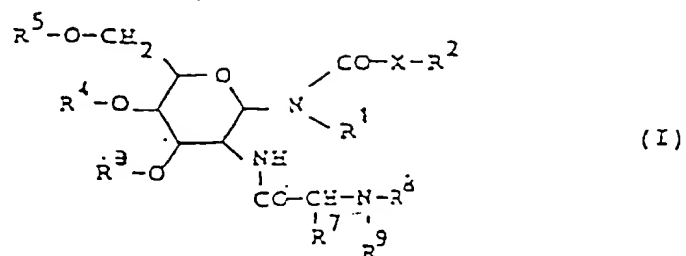
dans laquelle

- R<sup>1</sup> représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- X représente -CH<sub>2</sub>-, -O- ou -NH-,
- R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,

- R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl-CO-R<sup>6</sup>, dans lequel R<sup>6</sup> représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,
- R<sup>7</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoyleméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyleéthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolyleméthyle ou 4-imidazoleméthyle,
- R<sup>8</sup> représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- R<sup>9</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et
- R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.
2. Une composition selon la revendication 1, qui comprend au moins deux composés ; un premier composé étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et un deuxième composé étant sélectionné parmi des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyle, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.
3. Une composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le composé est une saponine qui est la fraction QS-21 purifiée à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria*.

4. Une composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle le composé est un lipide cationique mis sous forme de dispersion.
5. Une composition selon la revendication 1, 2 ou 4, dans laquelle le composé est un lipide cationique qui est le 3-bêta-(N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol) ou un sel de celui-ci.
6. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle le composé est un glycolipopeptide qui est le N-(2-L-leucinamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide (Bay R1005).
7. Une composition selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.
8. Une composition selon la revendication 7, dans laquelle l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est la sous-unité UreB ou UreA de l'uréase d'*Helicobacter*.
9. Une composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle l'agent immunogène est dérivé d'*Helicobacter pylori*.
10. L'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins un composé sélectionné parmi :
  - (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;
  - (ii) des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; à condition que ces lipides ne soient pas présentés sous forme de liposomes lorsque ladite composition ne contient pas de saponine ni de glycolipopeptide de formule (I) ; et

(iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle

- $R^1$  représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- $X$  représente  $-CH_2-$ ,  $-O-$  ou  $-NH-$ ,
- $R^2$  représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- $R^3$ ,  $R^4$  et  $R^5$  représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl- $CO-R^6$ , dans lequel  $R^6$  représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,
- $R^7$  représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en  $C_1-C_7$ , hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,
- $R^8$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- $R^9$  représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et

R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ;

dans la fabrication d'une composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*.

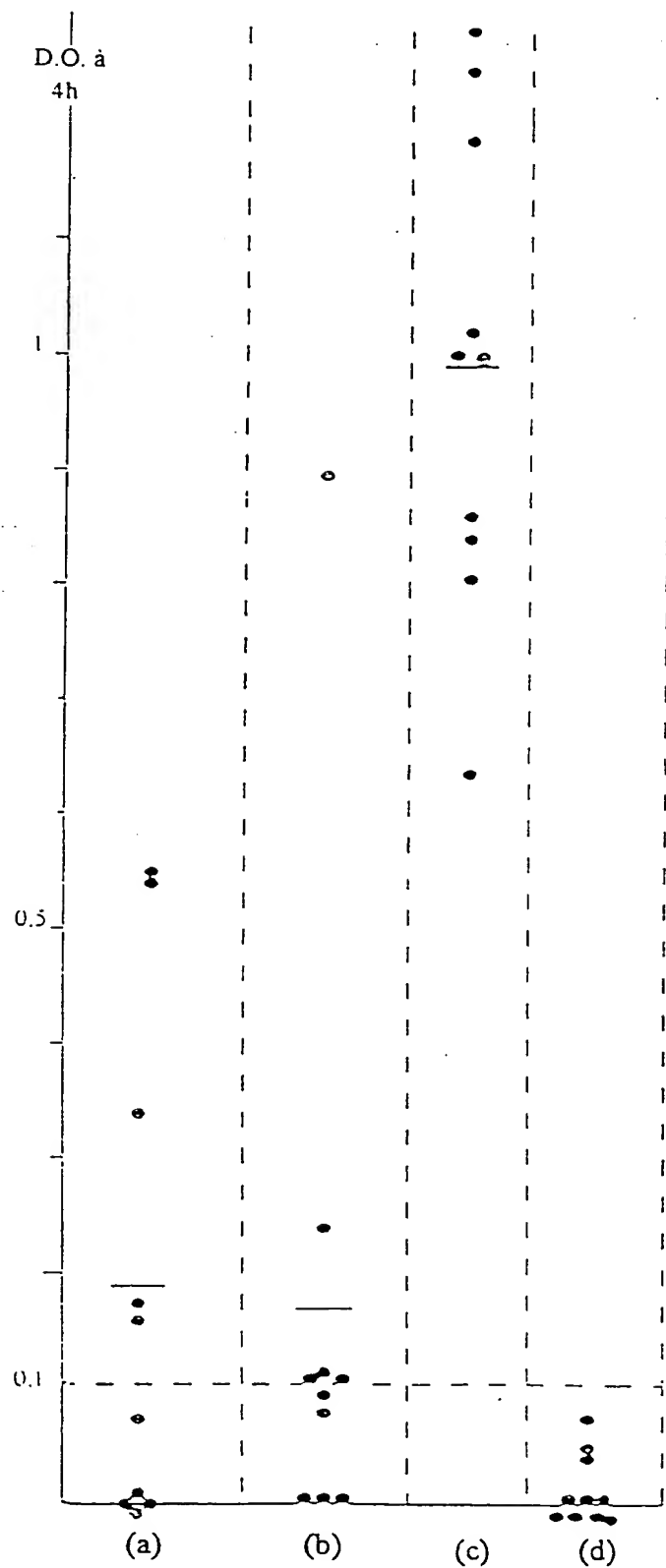
11. L'usage selon la revendication 10, d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins deux composés ; un premier composé étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et un deuxième composé étant sélectionné parmi des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.
12. L'usage selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le composé est une saponine qui est la fraction QS-21 purifiée à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria*.
13. L'usage selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le composé est un lipide cationique mis sous forme de dispersion.
14. L'usage selon la revendication 10, 11 ou 13, dans lequel le composé est le 3 bêta -(N-(N',N'-diméthyl aminoéthane)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol) ou un sel de celui-ci.
15. L'usage selon la revendication 10, dans lequel le composé est un glycolipopeptide qui est le N-(2-L-leucinamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide (Bay R1005).
16. L'usage selon l'une des revendications 10 à 15, dans lequel la réponse immune de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée soit (i) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 100 ou (ii) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgA supérieur ou égal à 1 : 100.

17. L'usage selon la revendication 16, dans lequel la réponse immune de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée soit (i) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 10 ou (ii) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgA supérieur ou égal à 1 : 10.
18. L'usage selon la revendication 17, dans lequel la réponse immune de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée soit (i) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 2 ou (ii) par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgA supérieur ou égal à 1 : 2.
19. L'usage selon l'une des revendications 10 à 18, dans lequel l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.
20. L'usage selon la revendication 19, dans lequel l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est la sous-unité UreB ou UreA de l'uréase d'*Helicobacter*.
21. L'usage selon l'une des revendications 10 à 20, dans lequel l'agent immunogène est dérivé d'*Helicobacter pylori*.
22. L'usage selon l'une des revendications 10 à 21, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique.
23. L'usage selon la revendication 22, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique stricte.
24. L'usage selon la revendication 22 ou 23, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique dans la partie d'un mammifère, notamment d'un primate située sous son diaphragme.
25. L'usage selon l'une des revendications 22 à 24, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique dans la région dorso-lombaire d'un mammifère, notamment d'un primate.

26. L'usage selon l'une des revendications 22 à 25, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par une voie systémique sélectionnée parmi la voie sous-cutanée, la voie intramusculaire et la voie intradermique.
27. L'usage selon l'une des revendications 10 à 26, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée deux ou trois fois par voie systémique au cours d'un même traitement, afin de prévenir ou de traiter une infection à *Helicobacter*.
28. L'usage conjoint d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, dans la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie systémique pour prévenir ou traiter une infection à *Helicobacter*.



Figure 1



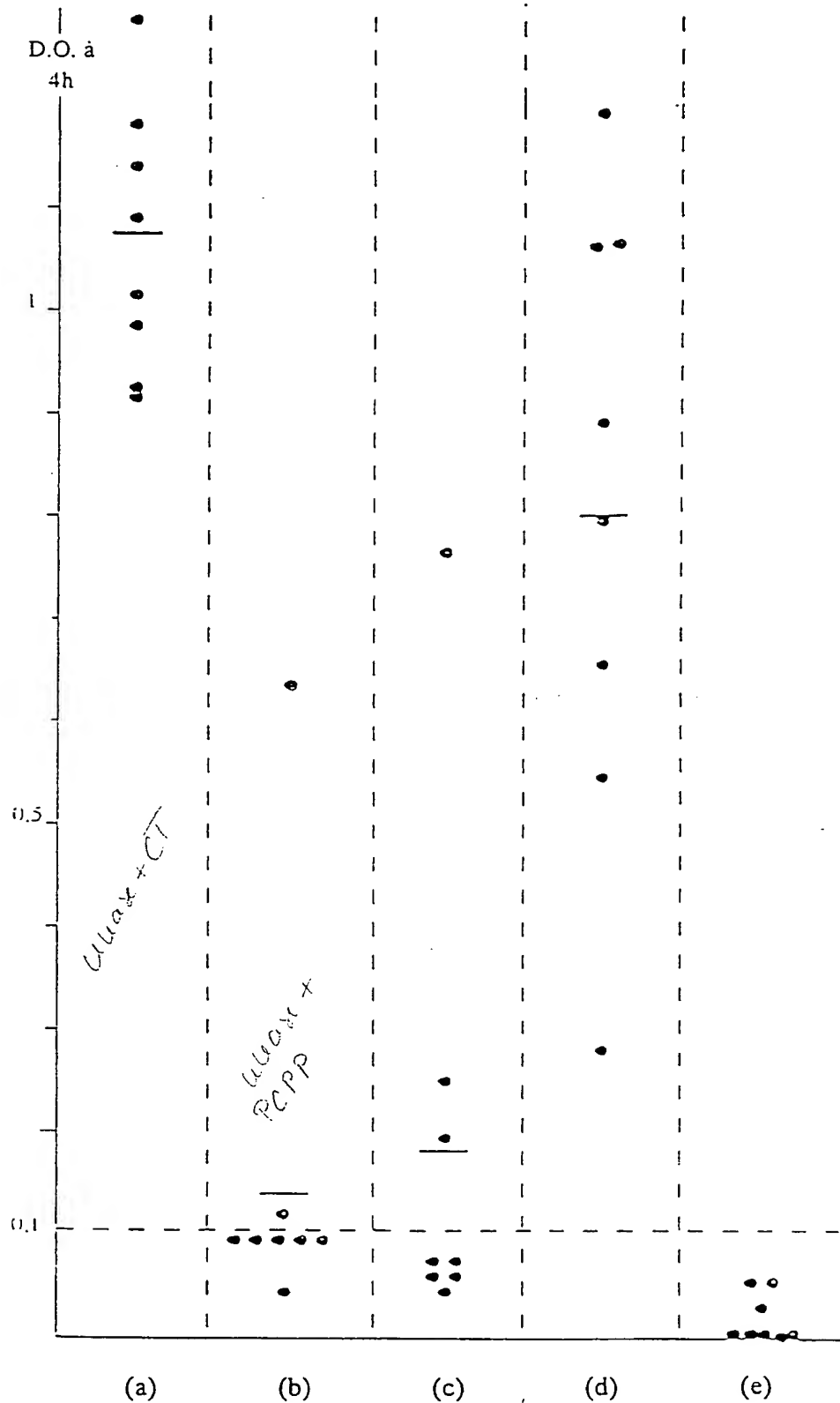
514-000-1-01

514 Rec'd PCT/PTO 0 1 NOV 1999

C

(

Figure 2

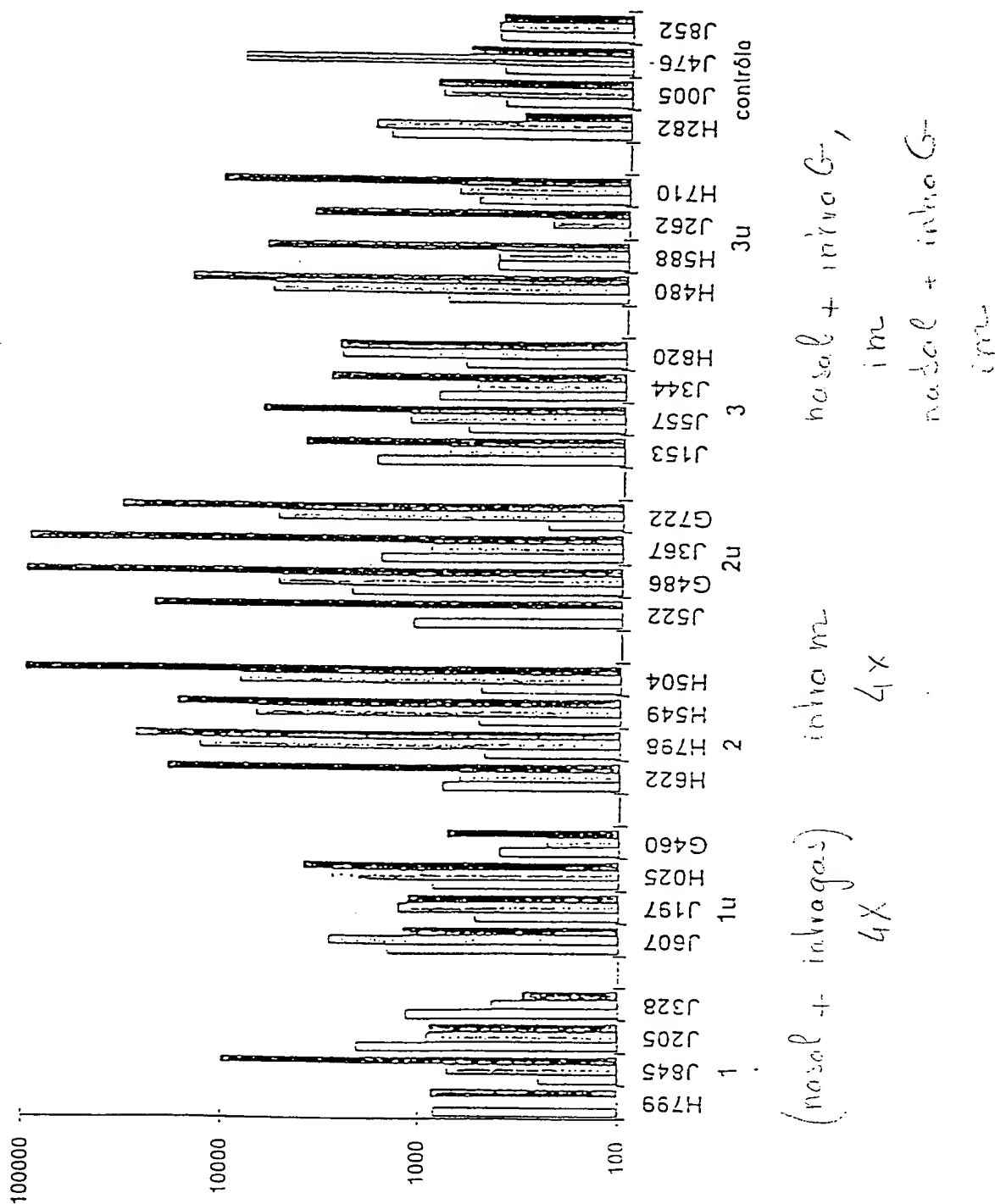


dessin pas bon

514 Rec'd PCT/PTO 0 1 Nov 1999

514

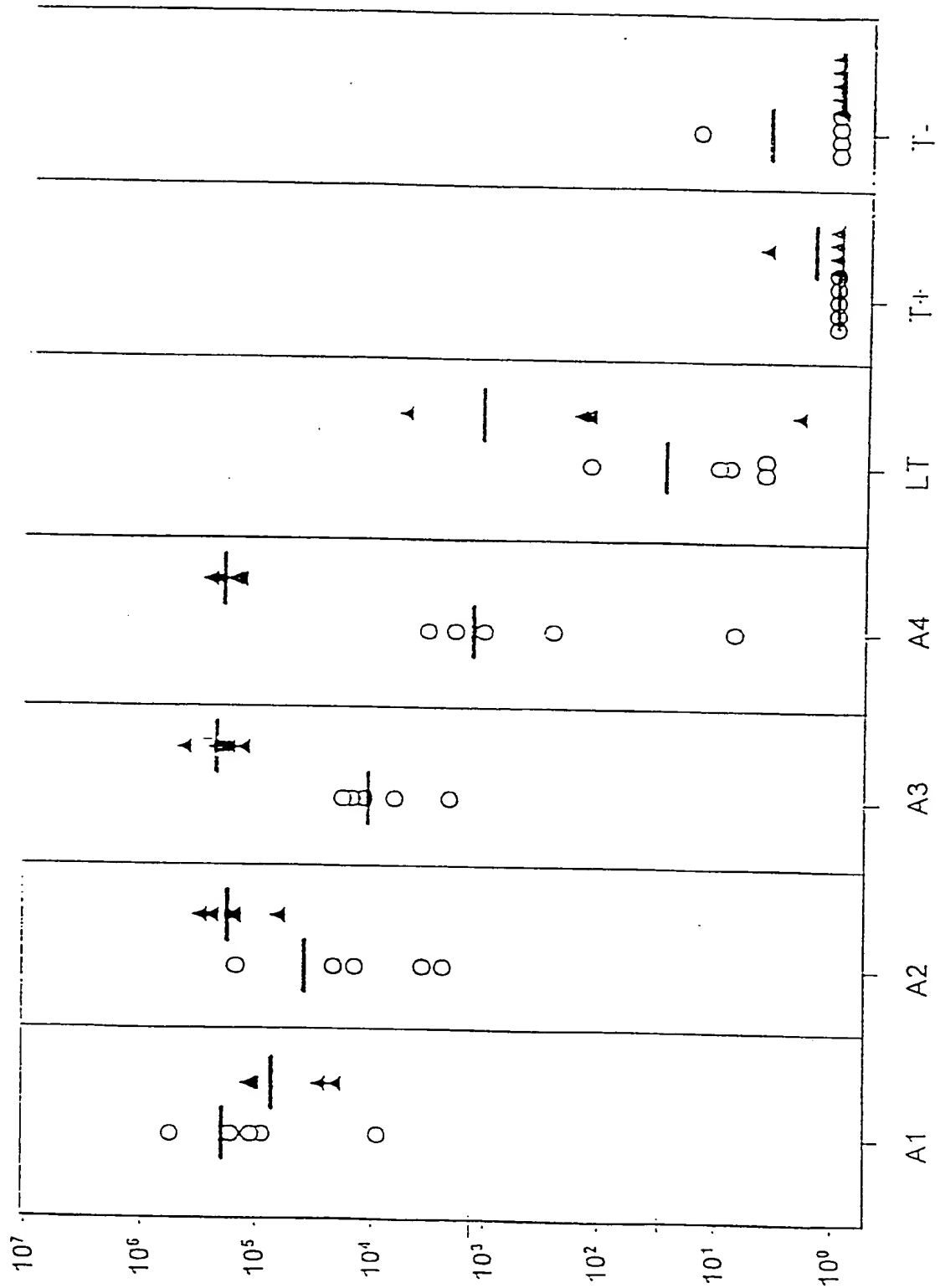
Figure 3



514 Rec'd PCT/PTO

0 1 NOV 1999

Figure 4

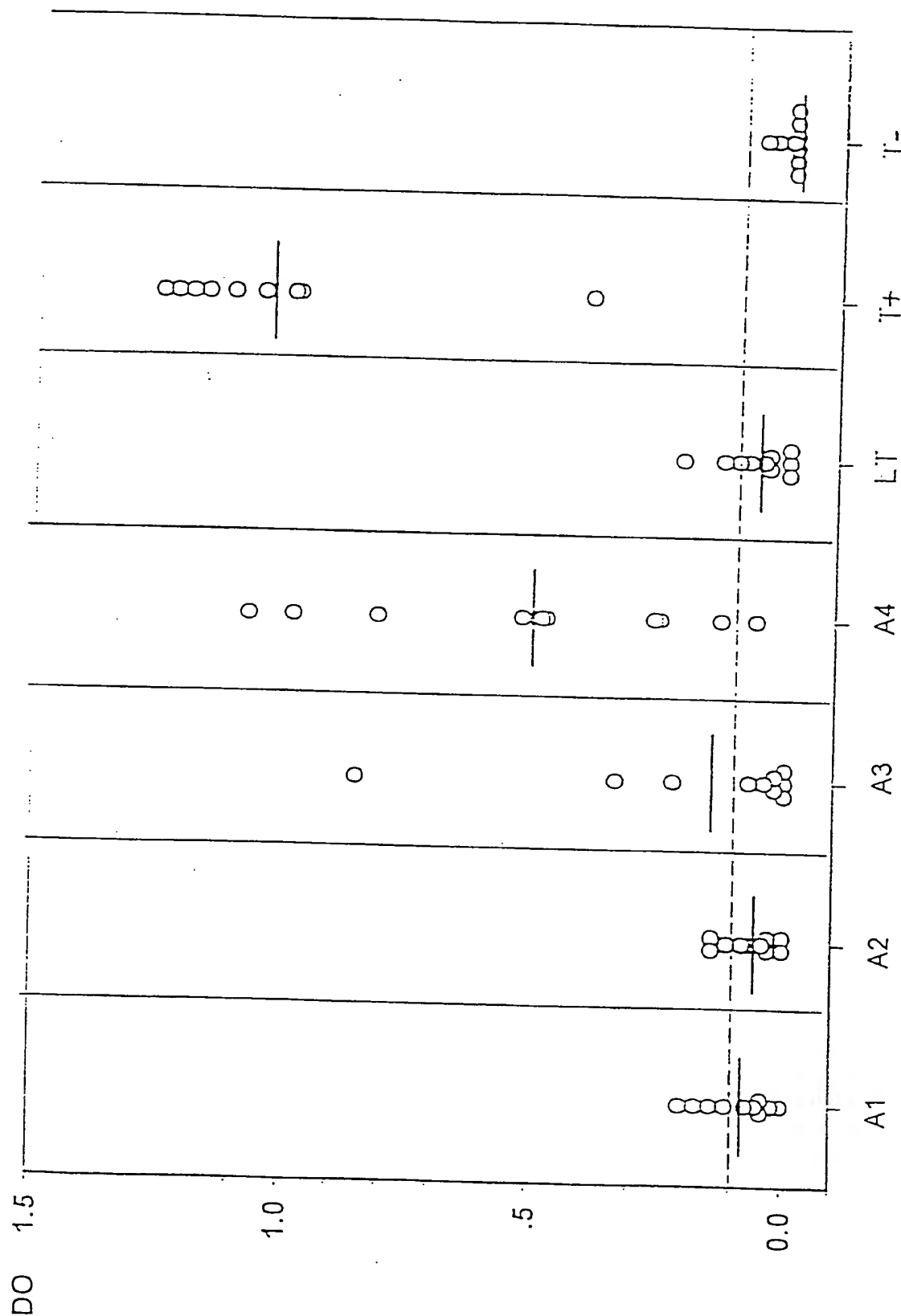


514 Rec'd PCT/PTO 0 1 NOV 1999

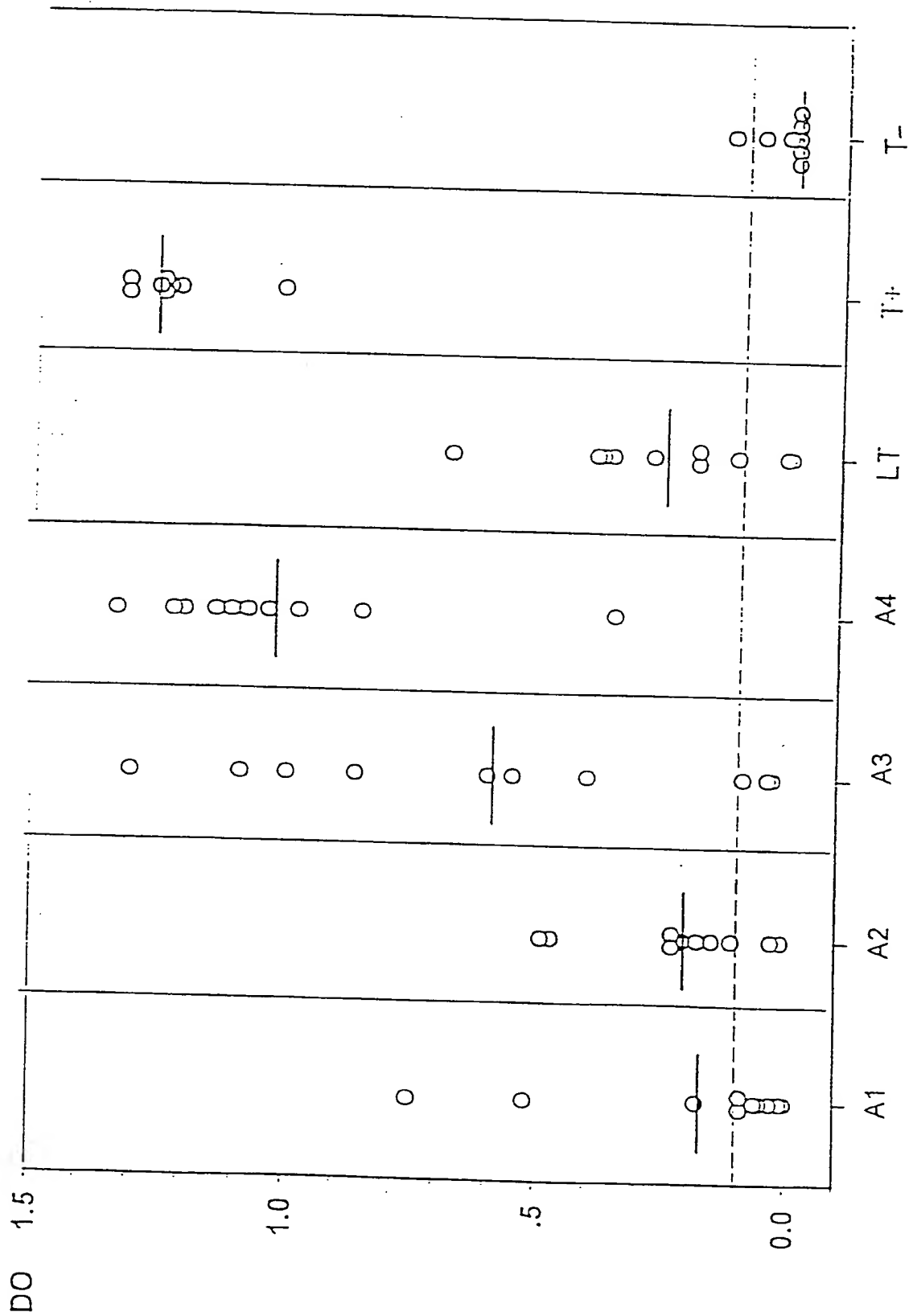


5/8

Figure 5

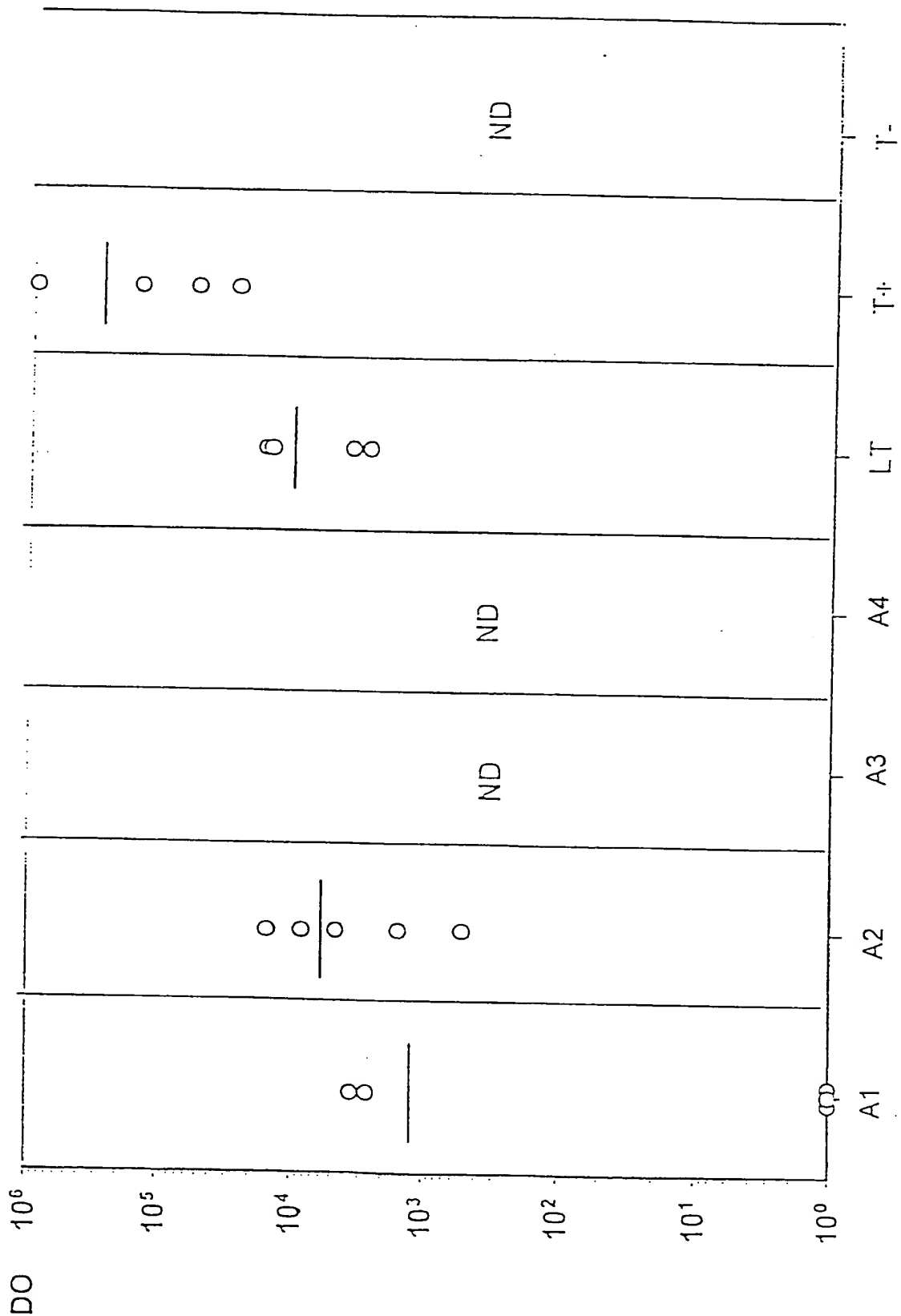


514 Rec'd PCT/PTO 8 1 NOV 1999

Figure 6

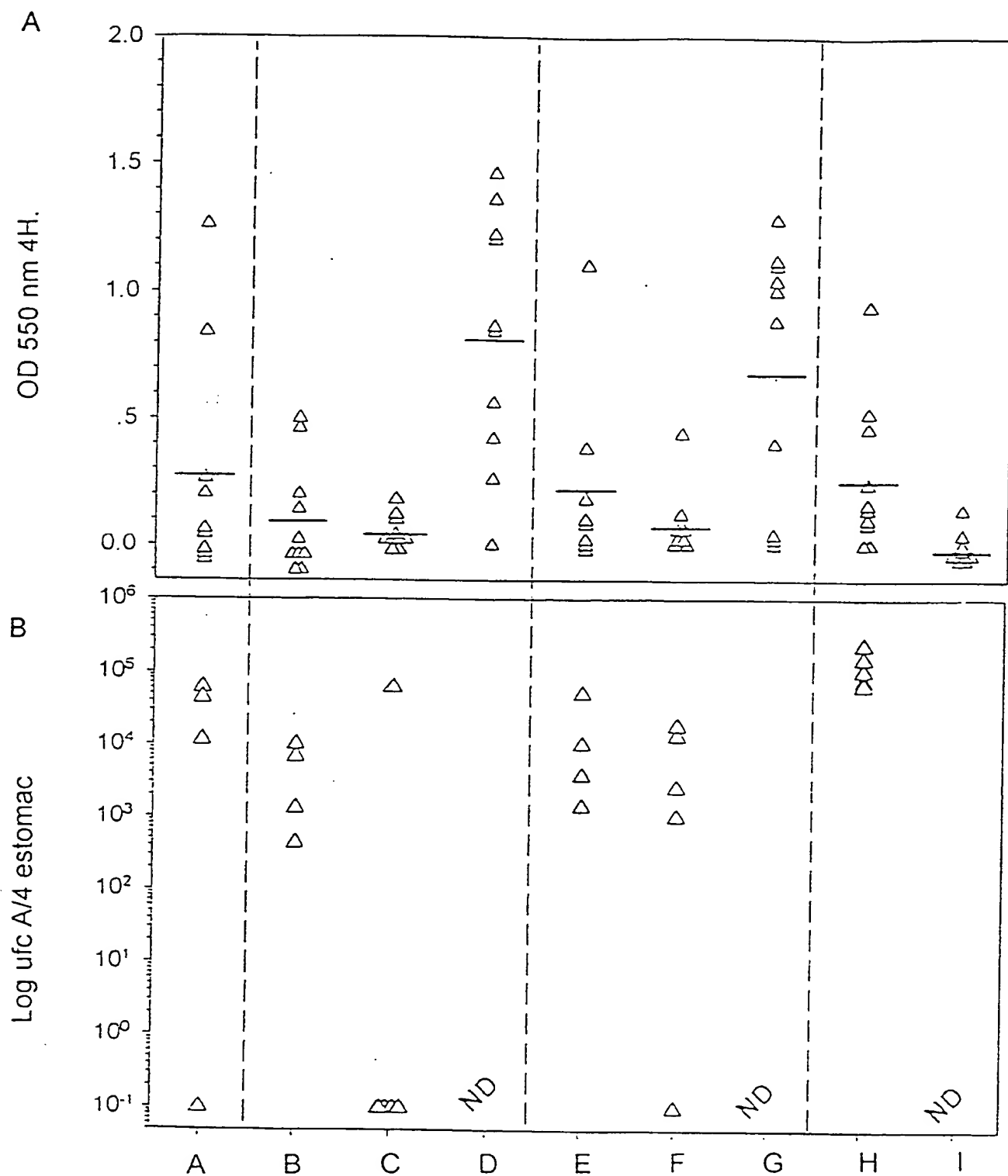
514 Rec'd PCT/PTO 31 NOV 1999

Figure 7



514 Rec'd PCT/PTO 3 1 NOV 1999

Figure 8A et 8B



514 Rec'd PCT/PTO 0 1 NOV 1992

1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00875

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/106

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 96 31235 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; GUY BRUNO (FR); HAENSLER JEAN (FR); Q) 10 October 1996 cited in the application see page 8, line 32 - page 16, line 11 see page 25 - page 35; examples 3-5 --- -/--</p>	<p>1, 4, 5, 7-9</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 1998

Date of mailing of the international search report

21/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00875

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOHAMMADI ET AL: "HELICOBACTER-SPECIFIC CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES DISPLAY A PREDOMINANT TH1 PHENOTYPE AND PROMOTE A DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY RESPONSE IN THE STOMACHS OF MICE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4729-4738, XP002052383 see page 4729 see abstract see page 4729, paragraph 3 see page 4737, paragraph 4 ----	28
A	D'ELIOS ET AL: "T HELPER 1 EFFECTOR CELLS SPECIFIC FOR HELICOBACTER PYLORI IN THE GASTRIC ANTRUM OF PATIENTS WITH PEPTIC ULCER DISEASE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, 15 January 1997, pages 962-967, XP002052384 cited in the application see page 962 see abstract ----	
A	WO 95 22987 A (ORAVAX INC) 31 August 1995 see page 18, line 2 - page 25, line 15 ----	
A	EP 0 206 037 A (BAYER AG) 30 December 1986 cited in the application see claim 26 ----	
A	WO 88 09336 A (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORP) 1 December 1988 cited in the application see page 15, paragraph 1 - page 16, paragraph 1 ----	
A	WO 93 05162 A (UNIV TENNESSEE RES CORP) 18 March 1993 cited in the application see page 5, paragraph 3 - page 6, paragraph 2 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00875

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9631235 A	10-10-1996	FR 2732605 A	11-10-1996
		AU 5504996 A	23-10-1996
		CA 2192473 A	10-10-1996
		EP 0765170 A	02-04-1997
		JP 10501556 T	10-02-1998
		NO 965207 A	05-12-1996
WO 9522987 A	31-08-1995	AU 694195 B	16-07-1998
		AU 1968195 A	11-09-1995
		BR 9506884 A	19-08-1997
		CA 2184057 A	31-08-1995
		CZ 9602503 A	11-12-1996
		EP 0751786 A	08-01-1997
		FI 963281 A	22-10-1996
		HU 75374 A	28-05-1997
		JP 9509661 T	30-09-1997
		NO 963508 A	21-10-1996
		PL 316007 A	23-12-1996
		SK 109496 A	09-07-1997
EP 0206037 A	30-12-1986	DE 3521994 A	02-01-1987
		AU 564222 B	06-08-1987
		AU 5897986 A	24-12-1986
		CA 1289952 A	01-10-1991
		CS 8604513 A	13-10-1989
		DE 3683410 A	27-02-1992
		DK 287886 A	21-12-1986
		FI 862619 A, B	21-12-1986
		IE 58918 B	01-12-1993
		JP 2077990 C	09-08-1996
		JP 7116207 B	13-12-1995
		JP 61293991 A	24-12-1986
		KR 9311281 B	29-11-1993
		PH 26775 A	13-10-1992
		PT 82796 B	15-12-1988
		US 4855283 A	08-08-1989
WO 8809336 A	01-12-1988	AT 116993 T	15-01-1995
		AU 616670 B	07-11-1991
		AU 1934088 A	21-12-1988

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00875

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8809336 A		CA 1331443 A	16-08-1994
		DE 3852761 D	23-02-1995
		DE 3852761 T	07-09-1995
		DK 602989 A	29-11-1989
		EP 0362279 A	11-04-1990
		JP 2504266 T	06-12-1990
		JP 2731563 B	25-03-1998
		US 5057540 A	15-10-1991
		US 5583112 A	10-12-1996
WO 9305162 A	18-03-1993	US 5283185 A	01-02-1994
		AU 665029 B	14-12-1995
		AU 2656592 A	05-04-1993
		CA 2116676 A	18-03-1993
		EP 0663013 A	19-07-1995
		JP 7500963 T	02-02-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR 98/00875

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K39/106

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 96 31235 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; GUY BRUNO (FR); HAENSLER JEAN (FR); Q) 10 octobre 1996 cité dans la demande voir page 8, ligne 32 - page 16, ligne 11 voir page 25 - page 35; exemples 3-5 ---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>1, 4, 5, 7-9</p>

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 septembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No  
PCT/FR 98/00875

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOHAMMADI ET AL: "HELICOBACTER-SPECIFIC CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES DISPLAY A PREDOMINANT TH1 PHENOTYPE AND PROMOTE A DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY RESPONSE IN THE STOMACHS OF MICE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4729-4738, XP002052383 voir page 4729 voir abrégé voir page 4729, alinéa 3 voir page 4737, alinéa 4</p>	28
A	<p>D'ELIOS ET AL: "T HELPER 1 EFFECTOR CELLS SPECIFIC FOR HELICOBACTER PYLORI IN THE GASTRIC ANTRUM OF PATIENTS WITH PEPTIC ULCER DISEASE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, 15 janvier 1997, pages 962-967, XP002052384 cité dans la demande voir page 962 voir abrégé</p>	
A	<p>WO 95 22987 A (ORAVAX INC) 31 août 1995 voir page 18, ligne 2 - page 25, ligne 15</p>	
A	<p>EP 0 206 037 A (BAYER AG) 30 décembre 1986 cité dans la demande voir revendication 26</p>	
A	<p>WO 88 09336 A (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORP) 1 décembre 1988 cité dans la demande voir page 15, alinéa 1 - page 16, alinéa 1</p>	
A	<p>WO 93 05162 A (UNIV TENNESSEE RES CORP) 18 mars 1993 cité dans la demande voir page 5, alinéa 3 - page 6, alinéa 2</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux inventions de familles de brevets

Demander internationale No

PCT/FR 98/00875

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9631235 A	10-10-1996	FR 2732605 A	11-10-1996
		AU 5504996 A	23-10-1996
		CA 2192473 A	10-10-1996
		EP 0765170 A	02-04-1997
		JP 10501556 T	10-02-1998
		NO 965207 A	05-12-1996
WO 9522987 A	31-08-1995	AU 694195 B	16-07-1998
		AU 1968195 A	11-09-1995
		BR 9506884 A	19-08-1997
		CA 2184057 A	31-08-1995
		CZ 9602503 A	11-12-1996
		EP 0751786 A	08-01-1997
		FI 963281 A	22-10-1996
		HU 75374 A	28-05-1997
		JP 9509661 T	30-09-1997
		NO 963508 A	21-10-1996
		PL 316007 A	23-12-1996
		SK 109496 A	09-07-1997
EP 0206037 A	30-12-1986	DE 3521994 A	02-01-1987
		AU 564222 B	06-08-1987
		AU 5897986 A	24-12-1986
		CA 1289952 A	01-10-1991
		CS 8604513 A	13-10-1989
		DE 3683410 A	27-02-1992
		DK 287886 A	21-12-1986
		FI 862619 A, B	21-12-1986
		IE 58918 B	01-12-1993
		JP 2077990 C	09-08-1996
		JP 7116207 B	13-12-1995
		JP 61293991 A	24-12-1986
		KR 9311281 B	29-11-1993
		PH 26775 A	13-10-1992
		PT 82796 B	15-12-1988
		US 4855283 A	08-08-1989
WO 8809336 A	01-12-1988	AT 116993 T	15-01-1995
		AU 616670 B	07-11-1991
		AU 1934088 A	21-12-1988

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 98/00875

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8809336 A		CA 1331443 A	16-08-1994
		DE 3852761 D	23-02-1995
		DE 3852761 T	07-09-1995
		DK 602989 A	29-11-1989
		EP 0362279 A	11-04-1990
		JP 2504266 T	06-12-1990
		JP 2731563 B	25-03-1998
		US 5057540 A	15-10-1991
		US 5583112 A	10-12-1996
WO 9305162 A	18-03-1993	US 5283185 A	01-02-1994
		AU 665029 B	14-12-1995
		AU 2656592 A	05-04-1993
		CA 2116676 A	18-03-1993
		EP 0663013 A	19-07-1995
		JP 7500963 T	02-02-1995



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 décembre 1998 (17.12.98)	
Demande internationale no PCT/FR98/00875	Référence du dossier du déposant ou du mandataire PM9706 PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 avril 1998 (30.04.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 30 avril 1997 (30.04.97)
Déposant GUY, Bruno etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

25 novembre 1998 (25.11.98)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

F. Baechler

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>PM9706 PCT</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 98/ 00875</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>30/04/1998</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>30/04/1997</b>
Déposant  <b>MERIEUX ORAVAX et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
2. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
3. ☐ La demande internationale contient la divulgation d'un **listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés** et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence
 

☐ déposé avec la demande internationale  
☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale  

☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.

☐ transcrit par l'administration
4. En ce qui concerne le titre, ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.  
☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:
5. En ce qui concerne l'abrégé,
 

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant  
☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.
6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:  
 Figure n°            ☐ suggérée par le déposant.  
☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.  
☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar: internationale No

PCT/ 98/00875

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 A61K39/106

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 31235 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; GUY BRUNO (FR); HAENSLER JEAN (FR); Q) 10 octobre 1996 cité dans la demande voir page 8, ligne 32 - page 16, ligne 11 voir page 25 - page 35; exemples 3-5 ----- -/-	1, 4, 5, 7-9



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 septembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/09/1998

Norm et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOHAMMADI ET AL: "HELICOBACTER-SPECIFIC CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES DISPLAY A PREDOMINANT TH1 PHENOTYPE AND PROMOTE A DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY RESPONSE IN THE STOMACHS OF MICE"</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4729-4738, XP002052383</p> <p>voir page 4729 voir abrégé voir page 4729, alinéa 3 voir page 4737, alinéa 4</p> <p>---</p>	28
A	<p>D'ELIOS ET AL: "T HELPER 1 EFFECTOR CELLS SPECIFIC FOR HELICOBACTER PYLORI IN THE GASTRIC ANTRUM OF PATIENTS WITH PEPTIC ULCER DISEASE"</p> <p>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, 15 janvier 1997, pages 962-967, XP002052384</p> <p>cité dans la demande voir page 962 voir abrégé</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 95 22987 A (ORAVAX INC) 31 août 1995 voir page 18, ligne 2 - page 25, ligne 15</p> <p>---</p>	
A	<p>EP 0 206 037 A (BAYER AG) 30 décembre 1986 cité dans la demande voir revendication 26</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 88 09336 A (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORP) 1 décembre 1988 cité dans la demande voir page 15, alinéa 1 - page 16, alinéa 1</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 93 05162 A (UNIV TENNESSEE RES CORP) 18 mars 1993 cité dans la demande voir page 5, alinéa 3 - page 6, alinéa 2</p> <p>-----</p>	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inform. patent family members

Inter. Application No

PCT/R 98/00875

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9631235 A	10-10-1996	FR 2732605 A	11-10-1996
		AU 5504996 A	23-10-1996
		CA 2192473 A	10-10-1996
		EP 0765170 A	02-04-1997
		JP 10501556 T	10-02-1998
		NO 965207 A	05-12-1996
WO 9522987 A	31-08-1995	AU 694195 B	16-07-1998
		AU 1968195 A	11-09-1995
		BR 9506884 A	19-08-1997
		CA 2184057 A	31-08-1995
		CZ 9602503 A	11-12-1996
		EP 0751786 A	08-01-1997
		FI 963281 A	22-10-1996
		HU 75374 A	28-05-1997
		JP 9509661 T	30-09-1997
		NO 963508 A	21-10-1996
		PL 316007 A	23-12-1996
		SK 109496 A	09-07-1997
EP 0206037 A	30-12-1986	DE 3521994 A	02-01-1987
		AU 564222 B	06-08-1987
		AU 5897986 A	24-12-1986
		CA 1289952 A	01-10-1991
		CS 8604513 A	13-10-1989
		DE 3683410 A	27-02-1992
		DK 287886 A	21-12-1986
		FI 862619 A, B	21-12-1986
		IE 58918 B	01-12-1993
		JP 2077990 C	09-08-1996
		JP 7116207 B	13-12-1995
		JP 61293991 A	24-12-1986
		KR 9311281 B	29-11-1993
		PH 26775 A	13-10-1992
		PT 82796 B	15-12-1988
		US 4855283 A	08-08-1989
WO 8809336 A	01-12-1988	AT 116993 T	15-01-1995
		AU 616670 B	07-11-1991
		AU 1934088 A	21-12-1988

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Informative patent family members

International Application No

PCT/AR 98/00875

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8809336 A		CA 1331443 A	16-08-1994
		DE 3852761 D	23-02-1995
		DE 3852761 T	07-09-1995
		DK 602989 A	29-11-1989
		EP 0362279 A	11-04-1990
		JP 2504266 T	06-12-1990
		JP 2731563 B	25-03-1998
		US 5057540 A	15-10-1991
		US 5583112 A	10-12-1996
WO 9305162 A	18-03-1993	US 5283185 A	01-02-1994
		AU 665029 B	14-12-1995
		AU 2656592 A	05-04-1993
		CA 2116676 A	18-03-1993
		EP 0663013 A	19-07-1995
		JP 7500963 T	02-02-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PCT**

REC'D 02 AUG 1999

WIPO PCT

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

(article 36 et règle 70 du PCT)

20

Référence du dossier du déposant ou du mandataire PM9706 PCT	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/00875	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/04/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 30/04/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K39/106		
Déposant MERIEUX ORAVAX et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
- ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).
- Ces annexes comprennent 43 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale  25/11/1998	Date d'achèvement du présent rapport  28.07.99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé  Stricker, J-E  N° de téléphone (+49-89) 2399 8395



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00875

**I. Base du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-35	reçue(s) le	14/05/1999	avec lettre du	10/05/1999
------	-------------	------------	----------------	------------

**Revendications, N°:**

1-28	reçue(s) le	14/05/1999	avec lettre du	10/05/1999
------	-------------	------------	----------------	------------

**Dessins, feuilles:**

1/8,2/8,4/8-8/8	version initiale			
3/8	reçue(s) le	14/05/1999	avec lettre du	10/05/1999

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation :**

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**4. Observations complémentaires, le cas échéant :**

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00875

- ☒ les revendications n°s 10-28.

parce que :

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 10-28, concernant l'application industrielle en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

**voir feuille séparée**

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas claires, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :

- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.

- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications aucune
Activité inventive	Oui : Revendications 1-28
	Non : Revendications aucune
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-9
	Non : Revendications -

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00875

---

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Section III**

L'objet des revendications 10-28 est considéré par cette Administration comme entrant dans le cadre de la Règle 67.1(iv) PCT. Par conséquent aucune opinion ne sera émise concernant l'application industrielle de l'objet de ces revendications (Article 34(4)(a)(i) PCT).

**Section V**

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO-A-96 31235
- D2: WO-A-88 09336
- D3: EP-A-0 206 037
- D4: WO-A-93 05162
- D5: MOHAMMADI ET AL: "HELICOBACTER-SPECIFIC CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES DISPLAY A PREDOMINANT TH1 PHENOTYPE AND PROMOTE A DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY RESPONSE IN THE STOMACHS OF MICE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4729-4738.
- D6: D'ELIOS ET AL: "T HELPER 1 EFFECTOR CELLS SPECIFIC FOR HELICOBACTER PYLORI IN THE GASTRIC ANTRUM OF PATIENTS WITH PEPTIC ULCER DISEASE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 158, 15 janvier 1997, pages 962-967.

1. Le document D1, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1, décrit une composition pharmaceutique destinée à induire chez un mammifère, une réponse immunitaire protectrice à l'encontre d'un antigène, au niveau d'un site mucosal effecteur comprenant deux ou trois produits (agents inducteurs) identiques ou différents, dont la formulation est adaptée à l'administration envisagée (cf. résumé). Le produit peut être un agent immunogène d'*Helicobacter pylori*, par exemple la sous unité ureA ou ureB de son uréase, ou un fragment d'ADN codant pour un antigène d'*H. pylori* (p. 14, l.28-38).  
Cet agent immunogène (protéine ou ADN) peut être présenté en formulation liposomale (exemples 3 à 5, en particulier des liposomes DC-Chol dans l'exemple 5) ou non (p.14, l.16).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

L'objet de la revendication 1 diffère donc de cette composition connue en ce qu'elle contient, en plus de l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter*, au moins un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 à l'encontre d'*Helicobacter* sélectionné parmi :

- des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria*
- des glycolipopeptides de formule (I)
- des lipides cationiques tels que décrit en (ii), pouvant se présenter sous forme de liposomes si la composition comprend également une saponine et/ou un glycolipopeptide tel que défini ci-dessus.

L'objet de la revendication 1 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

Le problème que l'objet de la revendication 1 se propose de résoudre peut donc être considéré comme la fourniture d'une composition pharmaceutique alternative comprenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter*.

Sachant que l'induction d'une réponse prédominante de type Th1 ou équilibrée Th1/Th2 était considérée comme néfaste et indésirable (cf. D5 et D6, résumés) l'homme du métier n'aurait pas utilisé ces composés pour résoudre le problème posé.

La solution proposée dans la revendication 1 de la présente demande est donc considérée comme inventive (Article 33(3) PCT).

2. Les revendications 2-9 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.
3. Le document D1, qui est considéré comme représentant l'état de la technique le plus pertinent, divulgue une composition pharmaceutique dont l'objet de la revendication 10 diffère en ce qu'elle contient un composé capable d'induire une réponse immune de type Th-1 à l'encontre d'*Helicobacter*.

L'objet de la revendication 10 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Le problème que l'objet de cette revendication se propose de résoudre peut donc être considéré comme la fourniture d'une composition pharmaceutique alternative comprenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter*.

La solution de ce problème proposée dans la revendication 10 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (Art. 33(3) PCT) pour les mêmes raisons que celle invoquées au paragraphe 1 ci-dessus.

4. Les revendications 11-27 dépendent de la revendication 10 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.
5. Le contenu de la revendication 28 est nouveau et inventif (Art. 33 (1)-(3) PCT) pour les mêmes raisons que celles concernant la revendication 10 (paragraphe 3 ci-dessus).
6. Il n'existe pas de critère unifié dans le PCT pour déterminer si les revendications 10-28 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office Européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, peuvent être acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

## **Section VII**

1. La figure 2 ne correspond ni à son descriptif (p.20, l.10-17), ni aux commentaires donnés p.25, l.24-30.
2. Le polyphosphazène (PCPP), qui permet d'obtenir un titre en IgG2a de 26200, est considéré comme n'étant pas un adjuvant utile pour l'induction d'une réponse Th-1 (page 26, tableau et lignes 19-23; page 33 lignes 24- 32). Ceci n'est pas

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

cohérent avec l'affirmation page 10, lignes 11-14.

### **Section VIII**

L'utilisation de liposomes DC-Chol comme unique adjuvant (exemple 1) est incohérente avec les caractéristiques du composé (ii) de la revendication 10.

Ce défaut de concordance entre les revendications et la description laisse planer un doute sur l'objet pour lequel une protection est demandée. Les revendications ne sont donc pas claires (article 6 PCT).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Composition vaccinale anti-*Helicobacter* comprenant un adjuvant de type Th1

La présente invention a pour objet l'usage particulier d'une préparation  
5 vaccinale destinée à induire chez un mammifère, une réponse immunitaire protectrice  
à l'encontre d'un organisme pathogène infectant des muqueuses, notamment à  
l'encontre des bactéries *Helicobacter*.

*Helicobacter* est un genre bactérien caractérisé par des bactéries spiralées à  
10 gram négatif. Plusieurs espèces colonisent le tractus gastrointestinal des mammifères.  
On cite en particulier *H. pylori*, *H. heilmanii*, *H. felis* et *H. mustelae*. Bien qu'*H.*  
*pylori* soit l'espèce la plus communément associée aux infections humaines, dans  
certains cas rares, *H. heilmanii* et *H. felis* ont pu être isolés chez l'homme. Une  
bactérie de type *Helicobacter*, *Gastrospirillum hominis* a également été décrite chez  
15 l'homme.

*Helicobacter* infecte plus de 50 % de la population adulte dans les pays  
développés et près de 100 % de celle des pays en voie de développement ; ce qui en  
fait un des agents infectieux prédominants au plan mondial.

20 *H. pylori* est retrouvée exclusivement à ce jour à la surface de la muqueuse de  
l'estomac chez l'homme et plus particulièrement autour des lésions de cratère des  
ulcères gastriques et duodénaux. Cette bactérie est à l'heure actuelle reconnue comme  
l'agent étiologique des gastrites antrales et apparaît comme un des cofacteurs requis  
25 pour le développement des ulcères. Par ailleurs, il semble que le développement des  
carcinomes gastriques puisse être associé à la présence d'*H. pylori*.

Il apparaît donc hautement souhaitable de mettre au point un vaccin en vue de  
prévenir ou de traiter les infections à *Helicobacter*.

30 A ce jour, plusieurs protéines d'*Helicobacter* ont déjà été proposées comme  
antigène vaccinal et la méthode de vaccination qui est couramment préconisée  
consiste à délivrer l'antigène au niveau de la muqueuse gastrique, c'est-à-dire à  
l'endroit même où la réponse immune est souhaitée. Pour ce faire, l'administration  
35 par voie orale a donc été retenue.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Toujours dans le même but (induction d'une réponse immunitaire au niveau de l'estomac), il a été proposé plus récemment, de délivrer l'antigène en un site muqueux autre que la muqueuse gastrique ; tel que par exemple la muqueuse nasale ou rectale (WO 96/31235). Des lymphocytes stimulés par l'antigène en un territoire muqueux dit inducteur peuvent migrer et circuler de manière sélective pour aller induire une réponse immunitaire en d'autres territoires muqueux, dits effecteurs.

Une variante aussi décrite dans WO 96/31235, consiste à effectuer une primo-immunisation par voie systémique avant d'administrer l'antigène par voie nasale.

10

L'exemple 5 de WO 96/31235 décrit une préparation dans laquelle l'uréase d'*H. pylori* (forme apo-enzymatique) est encapsulée dans des liposomes contenant du DC-chol. Cette préparation est par la suite utilisée dans deux protocoles d'immunisation rentrant dans le cadre de l'invention faisant l'objet de WO 96/31235. Après immunisation et épreuve les auteurs constatent une réduction significative de l'activité uréase, donc de l'infection.

WO 96/31235, en son exemple 5, prévoit uniquement l'usage du DC-chol sous forme de liposomes. Rien n'est ajouté en ce qui concerne les éventuelles vertus des liposomes-DC-chol et la nature de la réponse immune n'est pas analysée. Nulle part ailleurs, n'est indiqué ou suggéré l'usage du DC-chol à titre de simple adjuvant.

Pour administration par voie muqueuse, l'antigène, le plus souvent un lysat bactérien ou une protéine purifiée, est associé à un adjuvant approprié comme la toxine cholérique (CT) ou la heat-labile toxine (LT) d'*E. coli*.

Lorsque l'administration par voie muqueuse est mise en oeuvre, la réponse humorale que l'on observe, est de manière prédominante de type IgA. Ceci indique bien qu'il y a eu une réponse immunitaire locale.

30

Certains auteurs ont pensé très tôt qu'il existait une bonne corrélation entre une forte réponse de type IgA et un effet protecteur (Czinn et al, Vaccine (1993) 11 : 637). D'autres ont émis un avis plus réservé (Bogstedt et al, Clin. Exp. Immunol. (1996) 105 : 202). Bien qu'il n'existe pas à ce jour de véritable certitude concernant ce sujet, l'induction d'anticorps qui soient notamment de type IgA, apparaît quoi qu'il en soit souhaitable pour la plupart des auteurs.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



De manière générale, l'apparition des IgA témoigne de la mise en oeuvre d'une réponse de la part des lymphocytes T-helper de type 2 (réponse Th2).

En effet, la stimulation des lymphocytes T-helper par un antigène particulier permet d'obtenir différentes sous-populations de cellules T-helper, caractérisées par des profils de synthèse de cytokines différents.

Les cellules Th1 produisent notamment de manière sélective l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tandis que les cellules Th2 sécrètent de préférence l'IL-4, -5, et -10. En raison de leur production différenciée de cytokines, ces deux types de cellules T-helper ont des rôles distincts : les cellules Th1 favorisent l'immunité à médiation cellulaire *i.a.* une réponse de type inflammatoire, tandis que les cellules Th2 stimulent la réponse humorale de type IgA, IgE et de certaines sous-classes d'IgG. On sait aussi que les cytokines produites par des cellules Th1 de souris peuvent stimuler la réponse anticorps et en particulier que l'IFN- $\gamma$  induit une réponse IgG2a.

Ainsi, des différentes études de l'art antérieur, émerge l'opinion selon laquelle l'induction d'une réponse Th2 caractérisée par l'apparition d'IgA est indispensable, sinon suffisante, afin d'obtenir un effet protecteur.

De manière surprenante, on a maintenant découvert que, même si une réponse Th2 ne nuit pas, il est aussi nécessaire d'induire une forte réponse Th1. En effet, des résultats expérimentaux démontrent maintenant qu'un effet protecteur peut être corrélé plus aisément avec une réponse Th1 qu'avec une réponse Th2.

Contrairement à ce qui était initialement recherché (D'Elios et al, J. Immunol. (1997) 158 : 962), la présente demande révèle donc l'importance d'induire une réponse Th1 de type inflammatoire au moment de l'immunisation, sans laquelle on ne peut observer d'effet protecteur.

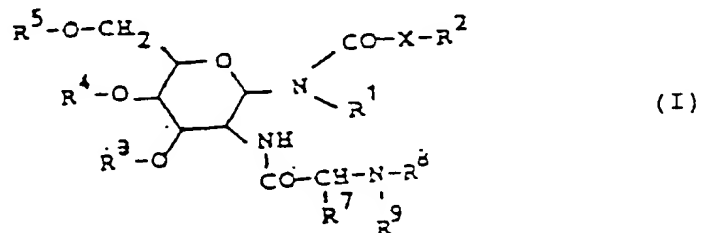
On peut parvenir à induire une réponse Th1 à l'encontre d'*Helicobacter* en jouant sur un certain nombre de facteurs, comme par exemple le type d'adjuvant. On a en effet mis en évidence qu'en utilisant certains adjuvants on peut obtenir un taux de protection similaire ou supérieur à celui observé lorsque l'on utilise la voie muqueuse et des adjuvants tels que les toxines bactériennes.

FEUILLE MODIFIEE

**PAGE BLANK (USPTO)**

En conséquence, la présente invention a pour objet :

- (a) L'usage conjoint d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, dans la fabrication d'un médicament destiné à être administrée par voie systémique pour prévenir ou traiter une infection à *Helicobacter*.
- (b) Une composition pharmaceutique qui comprend un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et au moins un composé (capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*) sélectionné parmi :
- (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;
- (ii) des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, à condition que ces lipides ne soient pas présentés sous forme de liposomes lorsque ladite composition ne contient pas de saponine ni de glycolipopeptide de formule (I) ; et
- (iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle :

R<sup>1</sup> représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone, de préférence 1 à 20 atomes de carbone,

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- X représente -CH<sub>2</sub>-, -O- ou -NH-,
- 5 R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone, de préférence 1 à 20 atomes de carbone,
- 10 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl-CO-R<sup>6</sup>, dans lequel R<sup>6</sup> représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,
- 15 R<sup>7</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,
- 20 R<sup>8</sup> représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- R<sup>9</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et
- 25 R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.
- (c) L'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins un composé sélectionné parmi les composés (i) à (iii) cités ci dessus, dans la
- 30 fabrication d'une composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter* ; et
- (d) Une méthode pour prévenir ou traiter une infection promue par un microorganisme capable d'infecter la muqueuse gastro-duodénale d'un
- 35 mammifère *e.g.*, une infection à *Helicobacter*, selon laquelle on administre au mammifère par voie systémique, en une ou plusieurs fois, une composition contenant au moins un agent immunogène dérivé dudit microorganisme *e.g.*

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

d'*Helicobacter* et au moins un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre *e.g.*, d'*Helicobacter*.

- 5 (e) Une méthode pour prévenir ou traiter une infection promue par un microorganisme capable d'infecter la muqueuse gastro-duodénale d'un mammifère *e.g.*, une infection à *Helicobacter*, selon laquelle on administre au mammifère, en une ou plusieurs fois, une composition contenant au moins un agent immunogène dérivé dudit microorganisme *e.g.* d'*Helicobacter* et au moins un composé sélectionné parmi les composés (i) à (iii) cités ci dessus, et  
10 par laquelle une réponse immunitaire de type Th1 est induite à l'encontre *e.g.* d'*Helicobacter*.

On peut mettre en évidence l'induction d'une réponse Th1 utile aux fins de la présente invention en estimant l'importance relative de la réponse Th1 par rapport à  
15 la réponse Th2, en comparant par exemple les taux d'IgG2a et d'IgG1 induits chez la souris à l'encontre d'*Helicobacter*, qui témoignent respectivement de la mise en oeuvre des réponses Th1 et Th2. En effet, la réponse Th1 que l'on recherche est généralement accompagnée d'une réponse Th2. Néanmoins, on considère que la réponse Th2 ne doit pas être significativement prédominante par rapport à la réponse  
20 Th1. Les taux d'IgG2a et d'IgG1 induits chez la souris peuvent être appréciés de manière conventionnelle à l'aide d'un test ELISA, à condition que les tests utilisés pour chacun des deux sous isotypes soient de même sensibilité et en particulier que les anticorps anti-IgG2a et anti-IgG1 soient de même affinité.

25 Les quantités d'IgG2a et d'IgG1 peuvent être notamment mesurées à l'aide d'un test ELISA identique ou similaire à celui décrit ci-après. Les puits d'une plaque ELISA en polycarbonate sont enduits avec 100 µl d'un extrait bactérien d'*Helicobacter e.g. H. pylori* à environ 10 µg/ml dans du tampon carbonate. La plaque ELISA est incubée 2 heures à 37°C puis une nuit à 4°C. La plaque est lavée  
30 avec du tampon PBS (phosphate buffer saline) contenant 0.05 % de Tween 20 (tampon PBS / Tween). Les puits sont saturés avec 250 µl de PBS contenant 1 % de serum albumine bovine afin d'empêcher la liaison non-spécifique des anticorps. Après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est lavée avec le tampon PBS / Tween. L'antisérum prélevé chez la souris, un certain nombre de jours après que cette  
35 dernière ait reçu la composition destinée à l'induction d'une réponse immune de type Th1 à l'encontre d'*Helicobacter*, est dilué en série dans du tampon PBS / Tween. 100 µl des dilutions sont ajoutés dans les puits. La plaque est incubée 90 minutes à 37°C,

THIS PAGE BLANK (USPTO)



lavée et évaluée selon des procédures standard. Par exemple, on utilise un anticorps de chèvre anti-IgG2a ou anti-IgG1 de souris couplé à une enzyme telle que la peroxydase. L'incubation en présence de cet anticorps est poursuivie 90 minutes à 37°C. On lave la plaque puis la réaction est développée avec le substrat approprié (par exemple de l'O-phenyldiamine dihydrochloride lorsque l'enzyme utilisée est la peroxydase). La réaction est évaluée par colorimétrie (en mesurant l'absorbance par spectrophotométrie). Le titre de l'antisérum en IgG2a ou en IgG1 correspond à l'inverse de la dilution donnant une absorbance de 1,5 à 490 nm.

10 L'induction d'une réponse Th1 utile aux fins de la présente invention est marquée par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 chez la souris qui doit être supérieur à 1/20, avantageusement supérieur à 1/10, de préférence supérieur à 1/3, de manière tout à fait préférée, supérieur à 1/2, 5 ou 10. Lorsque ce rapport est aux alentours de 1, on parle alors de réponse Th1 / Th2 mixte ou équilibrée. Lorsque le rapport est supérieur ou égal à 5, on peut alors parler de réponse Th1 prépondérante.

20 L'obtention d'une réponse Th1 (ou Th2) chez la souris est prédictive d'une réponse Th1 (ou Th2) chez l'homme. Bien qu'il soit plus facile d'évaluer le type de réponse chez la souris, on peut le faire également chez l'homme en mesurant les taux des cytokines spécifiques de la réponse Th1 d'une part et d'autre part de la réponse Th2, qui sont induites subséquentement. Les réponses Th1 et Th2 peuvent être évaluées directement chez l'homme l'une par rapport à l'autre sur la base des taux de cytokines spécifiques des deux types de réponse (voir ci-dessus) e.g., sur la base du rapport IFN- $\gamma$  / IL-4.

25 Alternativement, si la méthode de dosage décrite ci-dessus est mise en oeuvre, on peut prévoir que le titre ELISA qui reflète la quantité d'IgG2a, doit être égal ou supérieur à 100 000, de manière particulièrement préférée égal ou supérieur à 1 000 000 ; ceci signifie alors que la réponse Th1 est significative.

30 Le mammifère auquel est destinée la composition pharmaceutique ou la méthode est avantageusement un primate, de préférence un humain.

35 Des saponines utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrites dans le brevet US N° 5,057,540 par référence non à leurs structures mais aux fractions dans lesquelles elles sont présentes après fractionnement d'un extrait aqueux de l'écorce de *Quillaja saponaria* Molina, par chromatographie liquide à haute

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

pression (HPLC) et chromatographie à basse pression sur silice. En particulier on cite les fractions QA-7, QA-17, QA-18 et QA-21 aussi dénommée QS-21. L'usage de cette dernière est particulièrement avantageux. Le QS-21 est connu pour être un adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse immune majoritairement de type Th1.

5 On parle alors d'adjuvant de type Th1.

Des lipides cationiques utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrits dans le brevet US N° 5,283,185. A titre d'exemple, on cite le iodure de cholesteryl-3 $\beta$ -carboxyl-amido-ethylenetrimethylammonium, le iodure de 1-  
10 dimethylamino-3-trimethylammonio-DL-2-propyl-cholesteryl carboxylate, le iodure de cholesteryl-3 $\beta$ -carboxyamidoethyleneamine, le iodure de cholesteryl-3 $\beta$ -oxysuccinamidoethylenetrimethylammonium, le iodure de 1-dimethylamino-3-trimethylammonio-DL-2-propyl-cholesteryl-3 $\beta$ -oxysuccinate, le iodure de 2-[(2-trimethylammonio)-ethylmethylamino] ethyl-cholesteryl-3 $\beta$ -oxysuccinate, le 3 $\beta$ -[N-  
15 (polyethyleneimine)-carbamoyl] cholesterol, et le 3 $\beta$  [N-(N', N'-dimethylaminoethane) carbamoyl] cholesterol (DC-chol) ou un sel de ce dernier. Le DC-chol (ou sa forme saline) est connu pour être un adjuvant qui favorise l'induction d'une réponse équilibrée mixte de type Th1 / Th2. On parle alors d'adjuvant de type Th1 / Th2 ou Th1 + Th2.

20

Ces lipides cationiques peuvent être utilisés en dispersion ou bien mis sous forme de liposomes. Des liposomes peuvent être réalisés comme cela est décrit dans le brevet US N° 5,283,185, en associant les lipides cationiques avec un phospholipide neutre *e.g.*, la phosphatidylcholine ou la phosphatidylethanolamine.

25

Des glycolipopeptides utiles aux fins de la présente invention sont notamment décrits dans le brevet US N° 4,855,283 et EP 206,037. Il s'agit en particulier des glycolipides de formule générale (I) dans laquelle un reste de sucre est un reste 2-amino-2-désoxy-D-glucose ou 2-amino-2-désoxy-D-galactose. Le groupe 2-amino de  
30 l'amino-sucre peut être lié à la glycine, la sarcosine, l'acide hippurique, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la sérine, la thréonine, la cystéine, la méthionine, l'ornithine, la citrulline, l'arginine, l'acide aspartique, l'asparagine, l'acide glutamique, la glutamine, la phénylalanine, la tyrosine, la proline, le tryptophane ou l'histidine sous forme D ou L ou avec des acides aminocarboxyliques comme l'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, l'acide  $\alpha$ -aminovalériannique, l'acide  $\alpha$ -aminocaproïque ou l'acide  $\alpha$ -aminoheptanoïque sous forme D ou sous forme L.  
35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Plus particulièrement, on cite les glycolipopeptides suivants :

- N-(2-glycinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoyl-  
amide,
- N-(2-glycinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-actadecanoylamide,
- 5 N-(2-glycinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-tetradecyl-dodecanoylamide,
- N-(2-L-alaninamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoylamide,
- N-(2-D-alaninamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-octadecanoylamide,
- N-(2-L-phenylalaninamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-octadecanoyl-  
amide,
- 10 N-(2-L-valinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide,
- N-(2-L-valinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-tetradecanoylamide,
- N-(2-L-leucinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-dodecyl-dodecanoylamide,
- N-(2-L-leucinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide  
(Bay R1005), et
- 15 N-(2-sarcosinamido-2-déoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide.

Une composition selon l'invention peut contenir un ou plusieurs composés  
précédemment cités. Selon un mode avantageux, on utilise deux composés ; (a) l'un  
étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja*  
20 *saponaria* et (b) l'autre étant sélectionné (i) soit parmi des lipides cationiques ou un  
sel de ces derniers, lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C  
et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un  
groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras  
espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes  
25 de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires,  
secondaires, tertiaires et quaternaires, (ii) soit parmi les glycolipopeptides de formule  
(I). A titre d'exemple on cite les mélanges QS21 + DC-Chol et QS-21 + Bay R1005.

D'autres adjuvants capable de favoriser une réponse immune de type Th1 (c'est-  
30 à-dire des adjuvants de type Th1 ou Th1 / Th2) existent dans l'état de la technique  
parmi lesquels l'homme du métier est capable de sélectionner celui qui correspond le  
mieux à ses besoins. A titre indicatif, on cite notamment les liposomes ; les ISCOMS  
; les microsphères ; les chocléates protéiques ; les vésicules formées de surfactants  
non-ioniques ; les dispersions d'amphiphiles cationiques dans de l'eau ; les émulsions  
35 huile/eau ; le muramidyldipeptide (MDP) et ses dérivés tels que le glucosyl  
muramidyldipeptide (GMDP), le thréonyl-MDP, le muramétide et la murapalmitine ;  
ainsi que divers autres composés tels que le monophosphoryl-lipide A (MPLA)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

lipopolysaccharide majeur de la paroi d'une bactérie, par exemple d'*E. coli*, de *Salmonella minnesota*, de *Salmonella typhimurium* ou de *Shigella flexneri* ; l'algane-glucane ; la gamma-inuline ; le calcitriol et la loxoribine.

5 Des liposomes utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi des liposomes pH-sensibles tels que ceux formés par mélange de d'hémisuccinate de cholestérol (CHEMS) et de dioleyle phosphatidyle éthanolamine (DOPE) ; des liposomes contenant des lipides cationiques reconnus pour leurs propriétés fusiogènes, tels que le 3 bêta -(N-(N',N'-diméthyle aminoéthane)-  
 10 carbamoyl) cholestérol (DC-chol) et ses équivalents décrits dans le brevet US N° 5,283,185 et WO 96/14831 ou un sel de ceux-ci, le bromure de dimethyldioctadecylammonium (DDAB) et les composés BAY décrits dans EP 91645 et EP 206 037, par exemple le Bay R1005 (N-(2-desoxy-2-L-leucylamino-  
 15 bêta-D-glucopyranosyl)-N-octadecyle dodecanoylamide acétate ; et des liposomes contenant du MTP-PE, un dérivé lipophile du MDP (muramidyl dipeptide). Ces liposomes sont utiles pour adjuvanter tous les agents immunogènes cités.

Des ISCOMs utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi ceux composés de QuilA ou de QS-21 associé à du cholestérol et  
 20 éventuellement aussi à un phospholipide tel que la phosphatidylcholine. Ceux ci sont particulièrement intéressants pour la formulation des antigènes lipidés.

Des microsphères utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment formés à partir de composés tels que le polylactide-co-glycolide  
 25 (PLAGA), l'alginate, le chitosan, le polyphosphazène et de nombreux autres polymères.

Des chochléates protéiques utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnés parmi ceux formés à partir de cholestérol et éventuellement  
 30 d'un phospholipide additionnel tel que la phosphatidylcholine. Ceux-ci sont surtout intéressants pour la formulation des antigènes lipidés.

Des vésicules formées de surfactants non-ioniques utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment formées par un mélange de 1-monopalmitoyl  
 35 glycérol de cholestérol et de dicetylphosphate. Elles sont une alternative aux liposomes classiques et peuvent être utilisées pour la formulation de tous les agents immunogènes cités.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Des émulsions huile/eau utiles aux fins de la présente invention peuvent être notamment sélectionnées parmi le MF59 (Biocine-Chiron), le SAF1 (Syntex) et les montanides ISA51 et ISA720 (Seppic).

5

L'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est avantageusement sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.

10 Aux fins de la présente invention, une préparation de bactéries inactivées peut être obtenue selon des méthodes conventionnelles bien connues de l'homme de l'art. Il en est de même d'un lysat bactérien. Une dose de bactéries inactivées ou de lysat cellulaire, appropriée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, peut être déterminée par l'homme de l'art et dépend d'un certain nombre de facteurs tel que  
15 l'individu auquel est destiné le vaccin *e.g.*, âge, de l'antigène lui-même, de la voie et du mode d'administration, de la présence/absence ou du type d'adjuvant, ainsi que cela peut être déterminé par l'homme de l'art. D'une manière générale, on indique qu'une dose appropriée est d'environ 50 µg à 1 mg à environ 1 mg, de lysat.

20 Un peptide ou un polypeptide dérivé d'*Helicobacter* peut être purifié à partir d'*Helicobacter* ou obtenu par les techniques du génie génétique ou bien encore par synthèse chimique. Ce dernier procédé est avantageux dans le cas des peptides. On appelle "peptide" toute chaîne d'acides aminés dont la taille est inférieure à environ 50 acides aminés. Lorsque la taille est supérieure, on utilise le terme de "polypeptide"  
25 qui est aussi interchangeable avec le terme "protéine". Un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention peut être identique ou similaire à celui existant dans les conditions naturelles. Il est similaire en ce qu'il est capable d'induire une réponse immune de la même nature mais il peut comporter certaines variations structurales comme par exemple une mutation, l'adjonction d'un résidu de nature lipidique ou  
30 bien être sous forme de peptide ou de polypeptide de fusion.

Une dose du peptide ou du polypeptide, appropriée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, peut être déterminée par l'homme de l'art et dépend d'un certain nombre de facteurs tel que l'individu auquel est destiné le vaccin *e.g.*, âge, de  
35 l'antigène lui-même, de la voie et du mode d'administration, de la présence/absence ou du type d'adjuvant, ainsi que cela peut être déterminé par l'homme de l'art. D'une

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

manière générale, on indique qu'une dose appropriée est d'environ 10 µg à environ 1 mg, de préférence à environ 100 µg.

L'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* peut être n'importe quel polypeptide d'*Helicobacter e.g.*, d'*H. pylori*. Il peut notamment s'agir d'un polypeptide présent dans le cytoplasme, d'un polypeptide de la membrane interne ou externe ou d'un polypeptide sécrété dans le milieu extérieur. De nombreux polypeptides d'*Helicobacter* ont déjà été décrits dans la littérature, soit par référence à leur séquence d'acides aminés déduites de la séquence du gène correspondant cloné ou identifié, soit par référence à un procédé de purification qui permet de les obtenir sous forme isolée du reste de leur environnement naturel. A titre indicatif, on cite en particulier les document suivants : WO 94/26901 and WO 96/34624 (HspA), WO 94/09023 (CagA), WO 96/38475 (HpaA), WO 93/181150 (cytotoxine), WO 95/27506 et Hazell et al, J. Gen. Microbiol. (1991) 137 : 57 (catalase), FR 2 724 936 (recepteur membranaire de la lactoferrine humaine), WO 96/41880 (AlpA), EP 752 473 (FibA) and O'Toole et al, J. Bact. (1991) 173 : 505 (TsaA). D'autres polypeptides sont aussi décrits dans WO 96/40893, WO 96/33274, WO 96/25430 et WO 96/33220. Un polypeptide utile aux fins de la présente invention peut être identique ou similaire à l'un de ceux cités en référence dans la mesure où il est capable de promouvoir une réponse immune à l'encontre d'*Helicobacter*. A condition de remplir cette dernière condition, l'agent immunogène peut aussi être un peptide dérivé d'un polypeptide cité en référence.

De manière avantageuse, on utilise un polypeptide sélectionné parmi les sous-unités UreA et UreB de l'uréase d'*Helicobacter* (voir WO 90/4030). De préférence, on les utilise toutes les deux, associées en forme d'apoenzyme de l'uréase ou encore sous forme multimérique (voir WO 96/33732).

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut contenir un unique agent immunogène ou plusieurs. Par exemple une composition avantageuse peut comprendre UreA et UreB *e.g.*, sous forme d'apoenzyme, ainsi que un ou plusieurs autres polypeptides notamment sélectionnés parmi ceux cités ci-avant.

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut en outre contenir des composés autres que l'agent immunogène lui-même et l'adjuvant de type Th1 ou Th1/Th2 ; la nature de ces composés dépendant dans une certaine

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

mesure de la nature de l'agent immunogène, bactéries inactivées, lysat cellulaire, peptide ou polypeptide. Par exemple une composition peut aussi comprendre un adjuvant capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type Th2 *e.g.* un composé d'aluminium tel que l'aluminium hydroxide, l'aluminium phosphate ou l'aluminium hydroxy phosphate. Ceci peut être avantageux dans le cas où l'adjuvant utile au fins de la présente invention est un adjuvant de type Th1 tel que le QS-21.

L'efficacité thérapeutique ou prophylactique d'une méthode ou d'un usage selon l'invention peut être évaluée selon des méthodes standard *e.g.*, en mesurant l'induction d'une réponse immune ou l'induction d'une immunité thérapeutique ou protectrice en utilisant *e.g.*, le modèle souris / *H. felis* et les procédures décrits dans Lee et al, Eur. J. Gastroenterology & Hepatology (1995) 7 : 303 ou Lee et al, J. Infect. Dis. (1995) 172 : 161. L'homme de l'art s'avisera que *H. felis* peut être remplacé dans le modèle souris par une autre espèce d'*Helicobacter*. Par exemple, l'efficacité d'un agent immunogène dérivé d'*H. pylori* est de préférence évalué dans un modèle souris mettant en oeuvre une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris. L'efficacité peut être déterminée en comparant le degré d'infection dans le tissu gastrique (en mesurant l'activité uréase, la charge bactérienne ou l'état de la gastrite) à celui d'un groupe contrôle. Il y a effet thérapeutique ou effet protecteur lorsque l'infection est réduite par comparaison au groupe contrôle.

Une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, elle peut être formulée avec un diluent ou un porteur acceptable d'un point de vue pharmaceutique *e.g.*, de l'eau ou une solution saline. En général, le diluent ou le porteur peut être sélectionné en fonction du mode et de la voie d'administration et selon les pratiques pharmaceutiques standard. Des porteurs ou des diluents appropriés ainsi que ce qui est indispensable à l'élaboration d'une composition pharmaceutique sont décrits dans *Remington's Pharmaceutical Sciences*, un livre de référence standard dans ce domaine.

Les méthodes selon l'invention ainsi que les compositions utiles à ces fins peuvent être mises en oeuvre pour traiter ou prévenir *i.a.* les infections à *Helicobacter* et par conséquent, les maladies gastroduodénales associées à ces infections, y compris les gastrites aiguës, chroniques ou atrophiques, les ulcères peptiques *e.g.*, les ulcères gastriques ou duodénaux.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être administrée de manière conventionnelle notamment par voie muqueuse *e.g.*, par voie oculaire, orale *e.g.* buccale ou gastrique, pulmonaire, intestinale, rectale, vaginale ou urinaire ou par voie systémique, notamment parentérale *e.g.*, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intraépidermique et sous-cutanée. De préférence, on utilise la voie parentérale. Lorsque la voie parentérale est mise en oeuvre, on choisit de préférence un site d'administration situé sous le diaphragme d'un individu. La région dorso-lombaire constitue par exemple un site d'administration approprié, notamment pour les voies intraépidermiques, intramusculaire, intradermique et sous-cutanée ; ces dernières étant choisies de préférence à la voie intraveineuse.

Afin d'obtenir un effet protecteur ou thérapeutique, l'opération qui consiste à administrer une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention peut être répétée une ou plusieurs fois, de préférence au moins deux fois, en laissant un certain intervalle de temps entre chaque administration ; intervalle qui est de l'ordre de la semaine ou du mois. Sa détermination précise est à la portée de l'homme du métier et peut varier en fonction de divers facteurs tels que la nature de l'agent immunogène, l'âge de l'individu, etc.

Selon un mode particulier, le protocole de vaccination est mis en oeuvre en utilisant la même voie d'administration lors de la primo-immunisation et des rappels. Dans ce cas là, on parle par exemple d'administration systémique stricte.

"Une méthode dans laquelle l'administration de l'agent immunogène est mise en oeuvre par voie systémique stricte" est définie comme une méthode ne mettant pas en jeu de voie d'administration autre que la voie systémique. Par exemple, une méthode dans laquelle l'agent immunogène est administré par voie systémique et par voie muqueuse, ne répond pas à la définition énoncée ci-avant. En d'autres termes, "une méthode dans laquelle l'administration de l'agent immunogène est mise en oeuvre par voie systémique stricte" doit être comprise comme une méthode dans laquelle l'agent immunogène est administré par voie systémique à l'exclusion de toute autre voie, notamment la voie muqueuse.

A titre illustratif non-limitatif, on évoque un schéma de vaccination qui consiste à administrer l'apoenzyme de l'uréase en association avec le QS-21, le DC-chol ou un de leurs équivalents, trois fois par voie sous-cutanée, dans la région dorso-lombaire avec un intervalle de deux à quatre semaines entre chaque administration.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



On peut aussi prévoir que l'administration d'une composition pharmaceutique selon la présente invention peut être une simple étape faisant partie d'un protocole de vaccination plus élaboré. Par exemple, une composition pharmaceutique selon la présente invention peut être précédée ou suivie de l'administration d'une composition pharmaceutique contenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* choisi de manière indépendante parmi ceux énoncés ci-avant ou parmi d'autres tels qu'un vecteur vaccinal ou une molécule d'ADN ; mais ne contenant pas de QS-21, de DC-chol ou un de leurs équivalents ; ceux-ci pouvant alors être remplacé par un tout autre adjuvant ; les deux compositions pouvant être administrées par des voies identiques ou différentes.

A titre illustratif non-limitatif, on évoque les protocoles suivants :

- Une primo-immunisation par voie systémique, avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21, suivie de deux rappels avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21 ou de LT par voie muqueuse ; et

- Une primo-immunisation par voie systémique, avec un poxvirus codant pour UreA et UreB suivie de deux rappels avec l'apoenzyme de l'uréase en présence de QS-21, par voie systémique ou muqueuse.

Des agents immunogènes autres que ceux décrits ci-avant et pouvant être utilisés dans un protocole de vaccination multi-étapes comprenant une étape d'administration mettant en jeu un médicament utile aux fins de la présente invention ou une composition selon la présente invention, peuvent être sélectionnés parmi une molécule polynucléotidique, notamment une molécule d'ADN comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule de mammifère ; ou bien encore un vecteur vaccinal comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans une cellule de mammifère (si il s'agit d'un vecteur viral) ou chez un procaryote (si il s'agit d'un vecteur bactérien).

La molécule d'ADN peut avantageusement être un plasmide qui est incapable à la fois de se répliquer et de s'intégrer de manière substantielle dans le génome d'un mammifère. La séquence codante citée ci-dessus est placée sous le contrôle d'un

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

promoteur permettant l'expression dans une cellule de mammifère. Ce promoteur peut être ubiquitaire ou spécifique d'un tissu. Parmi les promoteurs ubiquitaires, on cite le promoteur précoce du Cytomegalovirus (décrit dans le brevet US n° 4,168,062) et le promoteur du virus du sarcome de Rous (décrit dans Norton & Coffin, Molec. Cell. Biol. (1985) 5 : 281). Le promoteur desmine (Li et al, Gene (1989) 78 : 244443 ; Li & Paulin, J. Biol. Chem. (1993) 268 : 10403) est un promoteur sélectif permet l'expression dans les cellules musculaires et aussi dans les cellules de la peau. Un promoteur spécifique des cellules musculaires est par exemple le promoteur du gène de la myosine ou de la dystrophine. Des vecteurs plasmidiques que l'on peut utiliser aux fins de la présente invention sont décrits *i.a.*, dans WO 94/21797 et Hartikka et al, Human Gene Therapy (1996) 7 : 1205.

Dans une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention, la molécule nucléotidique *e.g.* la molécule d'ADN peut être formulée ou non. Le choix de la formulation est très varié. L'ADN peut être simplement dilué dans une solution acceptable d'un point de vue physiologique avec ou sans porteur. Lorsque ce dernier est présent, il peut être isotonique ou faiblement hypertonique et avoir basse force ionique. Par exemple, ces conditions peuvent être remplies par une solution de sucrose *e.g.* à 20 %.

De manière alternative, le polynucléotide peut être associé avec des agents qui favorise l'entrée dans la cellule. Ce peut être (ii) un agent chimique qui modifie la perméabilité cellulaire, telle que la bupivacaine (voir par exemple WO 94/16737) ou (ii) un agent s'associant au polynucléotide et agissant en tant que véhicule facilitant le transport du polynucléotide. Ce dernier peut être notamment des polymères cationiques *e.g.* de la polylysine ou une polyamine *e.g.* des dérivés de la spermine (voir WO 93/18759). Ce peut être également des peptides fusogéniques *e.g.* du GALA ou de la Gramicidine S (voir WO 93/19768) ou bien encore des peptides dérivés des protéines de fusion virales.

Il peut aussi s'agir de lipides anioniques ou cationiques. Les lipides anioniques ou neutres sont connus depuis longtemps comme pouvant servir d'agents de transport, par exemple sous forme de liposomes, à un grand nombre de composés y compris les polynucléotides. Une description détaillée de ces liposomes, de leurs constituants et de leurs procédés de fabrication est par exemple fournit par Liposomes : A Practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Les lipides cationiques sont aussi connus et communément utilisés comme agents de transport pour les polynucléotides. On cite par exemple la Lipofectin™ aussi connue sous le nom de DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride), le DOTAP (1,2-bis(oleyloxy)-3-(triméthylammonio) propane), le DDAB (dimethyldioctadecylammonium bromide), le DOGS (dioctadecylamidoglycyl spermine) et les dérivés du cholestérol tel que le DC-chol (3 bêta -(N-(N',N'-diméthyl aminoethane)-carbamoyl) cholestérol). Une description de ces lipides est fournie par EP 187,702, WO 90/11092, le brevet US N° 5,283,185, WO 91/15501, WO 95/26356 et le brevet US N° 5,527,928. Les lipides cationiques sont utilisés de préférence avec un lipide neutre tel que le DOPE (dioleyle phosphatidylethanolamine) comme par exemple cela est décrit dans WO 90/11092.

Des microparticules d'or ou de tungstène peuvent aussi être utilisées comme agents de transport, tel que c'est décrit dans WO 91/359, WO 93/17706 et Tang et al, Nature (1992) 356 : 152. Dans ce cas là, le polynucléotide est précipité sur les microparticules en présence de chlorure de calcium et de spermidine puis l'ensemble est administré par jet à haute vitesse dans le derme ou dans l'épiderme, à l'aide d'un appareil sans aiguille tel que ceux décrits dans les brevets US N° 4,945,050 et N° 5,015,580 et WO 94/24243.

La quantité d'ADN qui peut être utilisée pour vacciner un individu dépend d'un certain nombre de facteurs tels que par exemple la force du promoteur utilisé afin d'exprimer l'antigène, l'immunogénicité du produit exprimé, la condition du mammifère auquel est destinée l'administration (*e.g.*, le poids l'âge, et l'état de santé général), le mode d'administration et le type de formulation. En général une dose appropriée à un usage prophylactique ou thérapeutique chez un adulte de l'espèce humaine est d'environ 1 µg à environ 5 mg, de préférence d'environ 10 µg à environ 1 mg, et de manière tout particulièrement préférée d'environ 25 µg à environ 500 µg.

Parmi les agents immunogènes cités précédemment, on trouve les vecteurs vaccinaux. Parmi les vecteurs d'origine virale on trouve notamment les adénovirus et les poxvirus. Un exemple de vecteur dérivé d'un adénovirus ainsi qu'une méthode pour construire un vecteur capable d'exprimer une molécule d'ADN codant pour un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention sont décrits dans le brevet US N° 4,920,209. Des poxvirus qui peuvent être utilisés de même, sont par exemple les virus de la vaccine et du canarypox. Ils sont décrits de manière respective dans les brevets US N° 4,722,848 et 5,364,773 (voir aussi *e.g.*, Tartaglia et

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

al, Virology (1992) 188 : 217 et Taylor et al, Vaccine (1995) 13 : 539). Des poxvirus capable d'exprimer un peptide ou polypeptide utile aux fins de la présente invention peuvent être obtenus par recombinaison homologue tel que décrit dans Kieny et al, Nature (1984) 312 : 163, de manière à ce que le fragment d'ADN codant pour le peptide ou le polypeptide soit placé dans des conditions appropriées à son expression dans des cellules de mammifères. Un vecteur bactérien tel que le Bacille bilié de Calmette-Guérin peut être aussi envisagé.

D'une manière générale, la dose d'un vecteur viral destinée à des fins prophylactiques ou thérapeutiques peut être d'environ  $1 \times 10^4$  à environ  $1 \times 10^{11}$ , de manière avantageuse d'environ  $1 \times 10^7$  à environ  $1 \times 10^{10}$ , de préférence d'environ  $1 \times 10^7$  à environ  $1 \times 10^9$  unités formant plaques *per* kilogram.

Parmi les vecteurs bactériens, on cite notamment *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. Des souches mutantes non-toxiques de *Vibrio cholerae* qui peuvent être utiles comme vaccin vivant, sont décrites dans Mekalanos et al, Nature (1983) 306 : 551 et le brevet US N° 4,882,278 (souche dans laquelle une partie substantielle de la région codant pour chacun des deux allèles *ctxA* a été délétée de manière à ce qu'aucune toxine fonctionnelle ne puisse être produite) ; WO 92/11354 ( souche dans laquelle le locus *irgA* est inactivé par mutation ; cette mutation peut être combinée dans une même souche avec des mutations *ctxA*) ; at WO 94/1533 (mutant obtenu par délétion à qui il manque des sequences fonctionnelles *ctxA* et *attRSI*). Ces souches peuvent être modifiées génétiquement afin d'exprimer des antigènes hétérologues tel que décrit dans WO 94/19482.

Des souches atténuées de *Salmonella typhimurium* modifiées génétiquement ou non pour l'expression recombinante d'antigènes hétérologues, ainsi que leurs usage en tant que vaccins sont décrits dans Nakayama et al, BioTechnology (1988) 6 : 693 et WO 92/11361.

D'autres bactéries utiles en tant que vecteurs vaccinaux sont décrits dans High et al, EMBO (1992) 11 : 1991 et Sizemore et al, Science (1995) 270 : 299 (*Shigella flexneri*) ; Medaglini et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92 : 6868 (*Streptococcus gordonii*) ; et Flynn J.L. Cell. Mol. Biol. (1994) 40 (suppl. I) : 31, WO 88/6626, WO 90/0594, WO 91/13157, WO 92/1796 et WO 92/21376 (Bacille de Calmette Guérin).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Dans les vecteurs bactériens la séquence d'ADN codant pour un peptide ou polypeptide d'*Helicobacter* peut être insérée dans le génome bactérien ou bien rester à l'état libre, portée par un plasmide.

- 5 De même une molécule d'ADN ou un vecteur vaccinal peuvent comporter une séquence codant pour n'importe quel polypeptide ou peptide décrit ci-dessus.

10 Une molécule d'ADN, de préférence un vecteur vaccinal viral peut aussi comporter une séquence codant pour une cytokine, par exemple une lymphokine telle que l'interleukine-2 ou -12, sous le contrôle d'éléments appropriés pour expression dans une cellule de mammifère. Une alternative à cette option consiste aussi à ajouter dans une composition pharmaceutique utile aux fins de la présente invention comprenant une molécule d'ADN ou un vecteur, une autre molécule ou vecteur viral codant pour une cytokine.

15 D'une manière générale, l'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique destinée à traiter ou à prévenir une infection à *Helicobacter* qui comprend pour administration consécutive : (i) un premier produit contenant (a) un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* sélectionné de manière  
20 indépendante, parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée, et (b) un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type Th1 et (ii) un deuxième produit contenant un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* sélectionné de manière indépendante, parmi une préparation de  
25 bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée, une molécule d'ADN comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression et un vecteur vaccinal comportant une séquence codant pour un peptide ou un polypeptide d'*Helicobacter* placée sous le  
30 contrôle des éléments nécessaires à son expression ; de préférence à condition que, lorsqu'un premier produit contient un peptide ou un polypeptide et un deuxième produit contient une molécule d'ADN ou un vecteur vaccinal, ladite séquence codante de la molécule d'ADN ou du vecteur vaccinal code pour le peptide ou polypeptide contenu dans le premier produit.

35

Dans la description ci-avant on s'est essentiellement référé aux infections à *Helicobacter* et aux moyens de les combattre en prévention et en prophylaxie.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Neanmoins, on doit comprendre que les principes et méthodes énoncés ci-avant peuvent s'appliquer *mutatis mutandis* à toute autre infection induite par un microorganisme quelconque dont le siège est l'estomac le duodénum ou l'intestin.

- 5            On précise en outre que tous les documents publiés et cités dans la présente demande sont incorporés par référence.

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

- 10           La Figure 1 se réfère à l'Exemple 1 et présente les niveaux d'activité uréase après épreuve, mesurée 4 hrs après le sacrifice des souris ayant reçues par 3 fois, à J0, J28 et J56 : (a) une préparation d'uréase encapsulée à environ 80 % dans des liposomes DC-chol, dans les muscles dorso-lombaires ; ou (b) une préparation d'uréase adjuvantée par de la toxine cholérique, par voie intragastrique. Les  
15 expériences (c) et (d) correspondent respectivement aux témoins positifs et négatifs.

- La Figure 2 se réfère à l'Exemple 1 et présente les niveaux d'activité uréase après épreuve, mesurée 4 hrs après le sacrifice des souris ayant reçues par 3 fois, à J0, J28 et J56 : (a) une préparation d'uréase adjuvantée par de la toxine cholérique, par  
20 voie intragastrique ou (b) une préparation d'uréase adjuvantée par du PCPP, par voie sous-cutanée dans la partie sous-lombaire postérieure gauche ; ou (c) une préparation d'uréase adjuvantée par du QS-21, par voie sous-cutanée dans le bas du dos. Les expériences (c) et (d) correspondent respectivement aux témoins positifs et négatifs.

- 25           La Figure 3 présente les quantités d'immunoglobulines sériques induites chez les singes soumis à des protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 2, et exprimées en titre ELISA. Un groupe contrôle comprenant 4 singes et trois groupes test sont formés, chacun des groupes test comprenant 8 singes ; chaque groupe test est divisé en deux sous-groupes de 4 singes, l'un recevant uniquement la préparation  
30 *H. pylori* inactivée (1, 2 et 3) et l'autre recevant la préparation *H. pylori* inactivée et de l'uréase recombinante (1u, 2u et 3u). Le groupe 1 et 1u correspond au protocole d'administration [nasal + intragastrique, 4 fois] ; le groupe 2 et 2u correspond au protocole d'administration [intramusculaire, 4 fois] ; le groupe 3 et 3u correspond au  
35 protocole d'administration [nasal + intragastrique, intramusculaire, nasal + intragastrique, intramusculaire]. Le titre ELISA est mesuré trois fois : une première fois, à J0 (bande blanche), une deuxième fois à J42 (bande grise), une troisième fois à J78 (bande noire).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

La Figure 4 présente les quantités d'immunoglobulines sériques induites chez les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, et exprimées en titre ELISA. ○ indique le titre ELISA en IgG2a et ◆ indique le titre ELISA en IgG1. Deux groupes contrôle (témoins positif et négatif), quatre groupes test (A1 à A4) ainsi qu'un groupe de référence (LT) sont formés ; chacun des groupes comprenant 10 souris. Les mesures des quantités d'immunoglobulines sériques sont effectuées pour seulement 5 souris parmi les dix. Les souris des groupes A1 à A4 ont reçues des doses de 10 µg d'uréase par voie sous cutanée dans la partie sous-lombaire postérieure gauche, en présence de QS-21 (A1), Bay R1005 (A2), DC-chol (A3) ou de PCPP (A4). Les souris du groupe de référence ont reçues des doses de 40 µg d'uréase par voie orale en présence de la protéine heat-labile d'*E. coli*.

La Figure 5 présente les taux d'activité uréase mesurés au niveau de la muqueuse stomacale, à DO<sub>550</sub> 4 heures après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.

La Figure 6 présente les taux d'activité uréase mesurés au niveau de la muqueuse stomacale, à DO<sub>550</sub> 24 heures après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.

La Figure 7 présente la charge bactérienne mesurée au niveau de la muqueuse stomacale, après que les souris soumises aux protocoles d'immunisation décrits dans l'Exemple 3, aient été sacrifiées. Les groupes sont tels que décrits pour la Figure 4.

Les Figures 8A et 8B présentent l'activité uréase (Fig. 6A) évaluée après 4 hrs (OD à 550 nm) avec le Jatrox test (Procter & Gamble) et la charge bactérienne (Fig. 6B) chez des souris infectées par *H. pylori* et ensuite soumises à différents traitements A-H [A : LT + uréase par voie orale ; B : QS21 + uréase, par voie parentérale, au niveau du cou ; C : QS21 + uréase, par voie parentérale, dans la région lombaire ; D : QS21 seul par voie sous-cutanée, dans la région lombaire ; E : Bay R1005 + uréase, par voie parentérale, au niveau du cou ; F : Bay R1005 + uréase par voie parentérale, dans la région lombaire ; G : Bay R1005 seul, par voie sous-cutanée dans la région lombaire (contrôle) ; H : solution saline par voie sous-cutanée dans la région lombaire (contrôle positif)] I représente le contrôle négatif.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Exemple 1 : Etudes d'immunisation chez la souris

### 1A - Matériel et méthodes

5

#### Souris

Des souris femelles Swiss de 6/8 semaines ont été fournies par Janvier (France). Pendant toute la durée de l'expérience on a utilisé du matériel stérilisé ; les cages étaient protégées par des "isocaps" ; les souris ont été nourries avec de l'eau filtrée et des aliments irradiés.

10

#### Protocole d'administration

Lors de chaque expérience, les souris ont reçues 3 doses du même produit ; chaque dose à 28 jours d'intervalle (les jours 0, 28 et 56). L'administration du produit a été effectuée par voie nasale (jusqu'à 50 µl sur les souris éveillées), par voie orale (300 µl en 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> par gavage gastrique), ou par voie sous-cutanée (300 µl sous la peau du cou ou sous la peau du côté gauche de la région lombaire). Dans certains cas, une inoculation intramusculaire a été effectuée (50 µl) dans les muscles dorso-lombaires des souris anesthésiées. 10 µg d'uréase ont été administrés par voie nasale, sous cutanée ou intramusculaire, et 40 µg par voie orale. En ce qui concerne la préparation bactérienne inactivée, 400 µg de cellules ont été administrés par voie sous cutanée ou par voie orale.

15

20

#### Antigènes et adjuvants

L'apoenzyme de l'uréase de *H. pylori* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée comme cela a été décrit dans l'exemple 5 de WO96/31235. Dans la suite du texte pour désigner cette apoenzyme, on emploie le simple terme d'uréase.

25

Des liposomes DC-chol contenant de l'uréase sont préparés comme suit : Tout d'abord, afin d'obtenir un film lipidique sec contenant 100 mg de DC-chol (R-Gene Therapeutics) et 100 mg de DOPC (dioleylphosphatidylcholine) (Avanti Polar Lipids), on mélange ces produits sous forme de poudre dans environ 5 ml de chloroforme. On laisse la solution s'évaporer sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le film ainsi obtenu sur les parois du récipient est séché sous vide poussé pendant au moins 4 hrs. En parallèle, 20 mg d'un lyophilisat d'uréase et 100 mg de sucrose sont dilués dans 13.33 ml de tampon Hepes 20 mM pH 7.2. Dix ml de cette

30

35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



préparation (qui contient 1.5 mg d'uréase et 0.75 % de sucrose) est filtrée sur filtre Millex 0.220  $\mu\text{m}$ , puis utilisée pour réhydrater le film lipidique. La suspension est mise sous agitation pendant 4 hrs puis soit extrudée (10 passages sur membrane de polycarbonate 0.2  $\mu\text{m}$ ) ou microfluidisée (10 passages sous une pression de 500 kPa dans un microfluidiseur Y10 de Microfluidics Co). Dans la suspension de liposomes ainsi obtenue le taux d'uréase encapsulée est de 10 à 60 %. Cette suspension est lyophilisée après avoir ajusté la concentration en sucrose à 5 % (on ajoute 425 mg de sucrose pour 10 ml). Avant utilisation, le lyophilisat est repris par un volume d'eau ou de tampon approprié et la suspension est purifiée sur un gradient discontinu de sucrose (paliers de 0, 30 et 60 %) de manière à obtenir une préparation dans laquelle la quantité d'uréase encapsulée est supérieure à 70 % environ par rapport à la quantité totale d'uréase.

La toxine cholérique est utilisée comme adjuvant mucosal à raison de 10  $\mu\text{g}$  / dose d'uréase ou de préparation bactérienne.

Le QS-21 (Cambridge Biosciences) est utilisé comme adjuvant à raison de 15  $\mu\text{g}$  / dose d'uréase.

Le polyphosphazène (PCPP) (Virus Research Institute) est utilisé comme adjuvant à raison de 100  $\mu\text{g}$  / dose d'uréase.

### Epreuve

Deux semaines après le deuxième rappel, les souris ont été soumises à un gavage gastrique avec 300  $\mu\text{l}$  d'une suspension d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris, la souche ORV2002 ( $1 \times 10^7$  bactéries vivantes dans 200  $\mu\text{l}$  de PBS ;  $\text{DO}_{550}$  de 0.5 environ). Un groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même.

### 30 Analyse de l'épreuve

Quatre semaines après l'épreuve, les souris ont été sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales. Les estomacs ont été prélevés pour évaluer l'activité uréase et faire des analyses histologiques. L'activité uréase a été évaluée après 4 et 24 heures ( $\text{DO}$  à 550 nm) avec le Jatrox test, Procter & Gamble) et après 24 heures le nombre de souris encore négatives ( $\text{DO}$  inférieure à 0,1) a été relevé.

### Analyse de la réponse par ELISA

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Les analyses par ELISA ont été exécutées conformément au protocole standard (les conjugués biotinylés et la streptavidine peroxydase provenaient de chez Amersham et le substrat OPD (O-phenyldiamine dihydrochloride) de chez Sigma). Les plaques étaient enduites d'extraits *H. pylori* (5µg/ml) dans du tampon carbonate. Un sérum de  
5 contrôle de souris dirigé contre l'extrait d'*H. pylori* a été introduit dans chaque expérience. Le titre correspond à l'inverse de la dilution donnant une DO de 1,5 à 490 nm.

## 1B - Résultats

10

Les résultats sont présentés dans les Figures 1 et 2 décrites ci-avant et commentées comme suit :

15

Avant tout commentaires au sujet des Figures 1 et 2, on note que ces figures présentent les résultats obtenus avec l'antigène utilisé adjuvanté par de la toxine cholérique et administré par voie intragastrique. Cette expérience est dite expérience de référence standard dans la mesure où l'association de l'art antérieur CT / IG est celle qui donne les meilleurs résultats à ce jour.

20

La Figure 1 montre qu'une préparation d'uréase encapsulée dans des liposomes DC-chol donne d'aussi bons résultats que ceux obtenus dans l'expérience de référence standard.

25

De plus, on fait référence aux expériences (a) à (d) dont les résultats en termes d'activité uréase 4 hrs après que les souris aient été sacrifiées sont reportés dans la Figure 1 et on indique que le nombre de souris qui sont toujours négatives pour l'activité uréase 24 hrs après avoir été sacrifiées est respectivement (a) 5/10, (b) 4/10, (c) 0/10 et (d) 10/10. Ceci est en accord avec ce qui a été conclu au paragraphe précédemment ; à savoir que l'expérience (a) conduit à des résultats similaires à ceux  
30 obtenus lors de l'expérience de référence standard.

35

La Figure 2 montre qu'une préparation d'uréase adjuvantée par le QS-21 donne d'aussi bons résultats que ceux obtenus dans l'expérience de référence standard. De plus, cette figure montre que les résultats que l'on obtient en utilisant le PCPP à titre d'ajuvant sont beaucoup moins bons que ceux obtenus avec le QS-21. Ceci s'explique dans la mesure où le PCPP induit préférentiellement avec l'uréase une réponse de

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

type Th2 tandis que le QS-21 avec l'uréase induit une réponse équilibrée Th1/Th2 ; ainsi que cela est démontré dans le tableau ci après.

De plus, on fait référence aux expériences (a) à (e) dont les résultats en termes d'activité uréase 4 hrs après que les souris aient été sacrifiées sont reportés dans la Figure 2 et on indique que le nombre de souris qui sont toujours négatives pour l'activité uréase 24 hrs après avoir été sacrifiées est respectivement (a) 1/8, (b) 0/8, (c) 5/8, (d) 0/8 et (e) 10/10. Ceci est en accord avec ce qui a été conclu au paragraphe précédemment ; à savoir que l'expérience (c) conduit à des résultats similaires à ceux obtenus lors de l'expérience de référence standard.

Le tableau ci-après présente les quantités d'IgA, IgG1 et IgG2a sériques induites lors des expériences dont les résultats en termes d'activité uréase sont reportés dans les Figures 1 et 2 ainsi que le nombre de souris dont l'activité uréase est caractérisée par une DO inférieure à 0.1 après 4 et 24 hrs après sacrifice. Les quantités d'IgA, IgG1 et IgG2a sont exprimées en titre ELISA.

	urease CT IG	urease DC-chol SC	uréase PCPP SC	urease QS21 SC
IgA	45	0	58	1
IgG1	65700	620000	2930520	2970399
IgG2a	20200	321000	26200	1136095
DO < 0.1 4 hrs	5/10	5/10	0/8	6/8
DO < 0.1 24 hrs	4/10	5/10	0/8	5/8

Les résultats présentés dans le tableau ci-avant montrent que lorsque la voie sous-cutanée est employée (ainsi qu'un adjuvant approprié pour cette voie), le taux d'anticorps sérique est important ; ce qui n'est pas le cas après usage de la voie intragastrique (et de l'adjuvant qui est approprié à cette voie). De plus, ces résultats montrent que lorsque l'on utilise le DC-chol ou le QS-21, on obtient un fort taux d'IgG2a, comparable au taux d'IgG1 en ordre de grandeur. Ceci indique que ces

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

adjuvants ont la capacité d'induire non seulement une réponse Th2, mais aussi une réponse Th1. Par contre, lorsque l'on utilise le PCPP, le taux d'IgG2a obtenu est nettement plus faible que le taux d'IgG1. On en conclut que ce dernier adjuvant induit essentiellement une réponse Th2 et ne peut donc pas être un adjuvant utile aux fins  
5 de la présente invention.

## Exemple 2 : Etudes d'immunisation chez les singes

### 2A - Matériel et méthodes

10

#### Singes

Vingt huit singes (*Macaca fascicularis*) âgés de 2 ans et originaires de l'île Maurice ont été utilisés dans cette étude. Avant de sousmettre les singes aux différents protocoles d'immunisation décrits ci-après, une biopsie a révélé que la plupart d'entre  
15 eux étaient infectés de manière chronique par des organismes proches de *Gastrospirillum hominis* (GHLO) ou de *H. heilmanii*.

#### Protocoles d'administration

Puisque presque tous les singes étaient infectés par des GHLO, on a décidé de tester  
20 l'efficacité de différents protocoles en thérapie. Trois protocoles ont été mis en oeuvre, tels que résumés dans le tableau ci après :

Groupe	J0	J21	J42	J63
1 et 1u	IN + IG	IN + IG	IN + IG	IN + IG
2 et 2u	IM	IM	IM	IM
3 et 3u	IM	IN + IG	IM	IN + IG

On précise que l'administration par voie intramusculaire a été effectuée dans les  
25 muscles dorso-lombaires.

**THIS PAGE BLANK (USP 11)**



## Antigènes et adjuvants

Dans la mesure où il existe une réactivité croisée entre les GPLO et *H. pylori*, on a choisit d'utiliser une préparation de bactéries *H. pylori* inactivées, telle que décrite dans l'exemple 1A, seule ou en combinaison avec de l'uréase recombinante préparée selon la méthode référencée dans l'exemple 1A.

La heat-labile toxine d'*E. coli* (LT) (Sigma) ou la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB) (Pasteur Mérieux sérums & vaccins) a été utilisé comme adjuvant mucosal tandis que le DC-chol a été utilisé comme adjuvant parentéral. De la poudre de DC-chol est simplement réhydratée par une préparation d'antigène.

Les doses utilisées sont comme suit :

Voie	Germes	Urease	DC-chol	LT	CTB
IG	400 µg	2,5 mg	-	25 µg	-
IN	400 µg	400 µg	-	25 ng	25 µg
IM	400 µg	100 µg	400 µg	-	-

## Biopsies, test uréase et étude bactériologique / histologique

On a effectué une biopsie sur chacun des singes avant et après immunisation (un mois après le troisième rappel). A partir des biopsies, un test uréase et une étude histologique ont été mis en oeuvre.

L'activité uréase est évaluée en utilisant le kit Jatrox (Procter & Gamble). L'importance de cette activité est estimée comme suit, de manière décroissante : niveau 3, coloration rose apparaissant au cours des 10 premières minutes ; niveau 2, coloration rose apparaissant entre 10 et 30 minutes après l'adjonction des réactifs ; niveau 1, coloration rose apparaissant entre 30 min et 4 hrs et niveau 0, coloration faible ou inexistante après 4 hrs.

Les études histologiques ont été réalisées à partir de biopsies fixées dans du formol et la charge bactérienne quantifiée comme suit : absence de bactéries (0) ; quelques bactéries de type *Helicobacter* (0,5) ; d'assez nombreuses bactéries (1) ; de nombreuses bactéries (2) ; de très nombreuses bactéries (3). Une différence d'un

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

niveau (de 1 à 2 par exemple) correspond à un nombre 5 fois plus important de bactéries.

### Analyse de la réponse par test ELISA

- 5 Un test ELISA est mis en oeuvre comme décrit dans l'exemple 1A.

### 2B - Résultats

- 10 Le tableau ci-dessous est relatif à la charge bactérienne qui, avant et après immunisation, est appréciée à l'aide de deux tests : (i) en évaluant l'activité uréase et (ii) en effectuant une étude histologique. Les résultats y afférant sont présentés dans les colonnes 3 à 6. Les trois dernières colonnes indiquent pour chaque groupes (contrôle, 1, 2 ou 3) le nombre de singes pour lesquels la charge bactérienne reste inchangée après immunisation (→) d'après les deux tests ; ou apparaît moindre (↘) ou accrue (↗) dans au moins un des deux tests, l'autre test indiquant une charge bactérienne stationnaire. Lorsque les résultats des deux tests vont dans le même sens, la flèche ascendante ou descendante est double.
- 15

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Singes	Groupe	Activité Urease		Histologie		Variation		
		avant immunisation	après immunisation	avant immunisation	après immunisation	↘	→	↗
H 282	C	2-2	3-2	2	3-2	1/4	1/4	2/4 (2/4 ↗↗)
J 005	C	2-2	2-1	2	1-0			
J 852	C	0-0	2-0	0	1-1			
J 476	C	0-0	2-0	0	1-1			
H 799	1	2-2	2-2	2	2-2	1/8	5/8	2/8 (1/8 ↗↗)
J 845	1	2-2	3-2	2	2-1			
J 205	1	1-1	2-2	0	1			
J 328	1	2-2	1-2	3	3-2			
J 197	1u	2-2	3-2	2	3			
H 025	1u	2-2	2-2	1	1-1			
G 460	1u	2-2	3-2	3	2-3			
J 607	1u	2-2	2-2	2	2			
H 549	2	3-3	2-2	3	2-3	6/8	1/8	1/8
H 622	2	3-3	1-1	2	2-3			
H 504	2	3-3	1-1	2	2-1			
H 798	2	1-1	0-1	1	1-1			
J 367	2u	2-2	2-1	3	2-3			
G 486	2u	2-2	2-2	1	2-2			
J 522	2u	2-2	0-0	2	2-2			
G 722	2u	3-3	2-0	2	2-3			
H 820	3	3-3	2-2	3	2-2	5/8 (3/8 ↘↘)	0	3/8
J 557	3	2-2	1-0	2	1-2*			
H 588	3	2-2	2-0	3	1-2			
J 153	3	3-3	3-3	2	3-3			
H 480	3u	2-2	2-2	2	3-3			
J 344	3u	3-3	2-0	3	2-2			
H 710	3u	2-2	2-2	2	3-3			
J 262	3u	3-3	2-2	3	3-2			

Ainsi, ce tableau révèle que dans le groupe ayant été soumis à un protocole d'immunisation par la voie muqueuse stricte, les résultats sont sensiblement  
5 identiques à ceux obtenus avec le groupe contrôle négatif. Par contre, dans les

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

groupes ayant été soumis à un protocole d'immunisation par voie mixte muqueuse et intramusculaire ou par la voie intramusculaire stricte, on observe une nette réduction de la charge bactérienne. Ceci met en lumière l'importance des conditions d'immunisation et en particulier de l'adjuvant utilisé ; et en conséquence, on

5 recommande l'usage d'un adjuvant tel que le DC-chol, capable de favoriser une réponse Th1 et Th2 équilibrée, afin d'obtenir un effet protecteur.

Ces résultats sont à mettre en perspective avec d'autres résultats relatifs aux taux d'anticorps sériques qui sont présentés dans la Figure 3. Cette figure montre que que

10 le schéma d'immunisation par voie muqueuse stricte (1 et 1u) conduit à des résultats très similaires à ceux du groupe contrôle négatif. Par contre, le schéma d'immunisation par voie mixte muqueuse et intramusculaire ( 3 et 3u) et mieux encore le schéma d'immunisation par voie intramusculaire stricte ( 2 et 2u), permet d'induire des taux d'anticorps nettement supérieurs à ceux du groupe contrôle.

15 Ainsi, une réponse sérique importante peut être corrélée à un effet protecteur, tandis qu'a *contrario*, une faible réponse est liée à l'absence d'effet protecteur. Les conditions d'immunisation permettant d'obtenir l'effet désiré (réponse sérique importante et effet protecteur) inclut l'usage de la voie parentérale ciblée dans la

20 région sous-diaphragmatique ou celui d'un adjuvant Th1.

### **Exemple 3 : Autres études d'immunisation chez la souris**

#### **3A - Matériel et méthodes**

##### **Souris**

Des souris femelles Swiss de 6/8 semaines ont été fournies par Janvier (France). Pendant toute la durée de l'expérience on a utilisé du matériel stérilisé ; les cages étaient protégées par des "isocaps" ; les souris ont été nourries avec de l'eau filtrée et

30 des aliments irradiés.

##### **Protocole d'administration**

Lors de chaque expérience, les souris ont reçues 3 doses du même produit ; chaque dose à 21 jours d'intervalle (les jours 0, 21 et 42). L'administration du produit a été

35 effectuée par voie orale (300 µl en 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> par gavage gastrique), ou par voie sous-cutanée (300 µl sous la peau du côté gauche de la région lombaire). Dix µg d'uréase ont été administrés sous cutanée et 40 µg par voie orale.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## Antigènes et adjuvants

5 L'apoenzyme de l'uréase d'*H. pylori* a été exprimée dans *E. coli* et purifiée comme cela a été décrit dans l'exemple 5 de WO96/31235. Dans la suite du texte pour désigner cette apoenzyme, on emploie le simple terme d'uréase.

10 La heat-labile toxine d'*E. coli* (Sigma) est utilisée comme adjuvant mucosal à raison de 1 µg / dose d'uréase.

Le QS-21 (Cambridge Biosciences) est utilisé comme adjuvant à raison de 15 µg / dose d'uréase.

15 Le Bay R1005 (Bayer) est utilisé comme adjuvant à raison de 400 µg / dose d'uréase.

Le DC-chol (R-Gene Therapeutics) est utilisé comme adjuvant à raison de 65 µg / dose d'uréase.

20 Le polyphosphazène (PCPP) (Virus Research Institute) est utilisé comme adjuvant à raison de 100 µg / dose d'uréase.

## Epreuve

25 Quatre semaines après le deuxième rappel, les souris ont été soumises à un gavage gastrique avec 300 µl ( $3 \times 10^6$  bactéries vivantes) d'une suspension d'une souche d'*H. pylori* adaptée à la souris et résistante à la Streptomycine, la souche ORV2001. Un groupe n'ayant reçu aucune dose d'antigène et servant de contrôle est éprouvé de même.

30 La suspension d'épreuve est préparée comme suit : *H. pylori* est cultivée sur agar Muller-Hinton (Difco) contenant 5 % de sang de mouton (bioMérieux) (milieu MHA) qui contient les antibiotiques suivants de chez Sigma : Triméthoprim 5 µg/ml, Vancomycine 10 µg/ml, Polymixine B 1.3 µg/ml, Amphotéricine 5 µg/ml et Streptomycine 50 µg/ml. Les boîtes de culture sont incubées pendant 3 jours à 37°C dans des conditions de microaérophilie (Anaerocult C, Merck). Cette culture est récoltée pour ensemer un flacon pourvu d'évents de 75 cm<sup>2</sup> (Costar) contenant 50  
35 ml de Brucella broth complété par 5 % de sérum de veau foetal et par les antibiotiques sus-nommés. Le flacon est incubé dans des conditions de micro

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

aérophilie, sous agitation douce pendant 24 heures. La suspension est alors diluée en Brucella broth pour donner une DO de 0,1 à 550 nm (soit  $10^7$  CFU/ml).

### **Analyse de l'épreuve**

- 5 Quatre semaines après l'épreuve, les souris ont été sacrifiées par rupture des vertèbres cervicales. Les estomacs ont été prélevés pour évaluer l'activité uréase et la charge bactérienne par culture quantitative. Un quart longitudinal de l'estomac (antrum + corpus) est utilisé pour chacun des tests. L'activité uréase a été évaluée après 4 et 24 heures (DO à 550 nm) avec le Jatrox test, Procter & Gamble) et après 24 heures le
- 10 nombre de souris encore négatives (DO inférieure à 0,1) a été relevé.

### **Evaluation de l'infection par culture quantitative d'*H. pylori***

- Au moment où les souris sont sacrifiées, la muqueuse d'un quart de l'estomac de chaque souris est disposée dans le milieu Portagem de bioMérieux puis dans les deux
- 15 heures qui suivent, transférée en chambre de culture. L'échantillon est alors homogénéisé en utilisant un homogénéisateur de Dounce (Wheaton, Millville USA) contenant 1 ml de milieu Brucella (Brucella broth) et dilué en série jusqu'à  $10^{-3}$ . Cent  $\mu$ l de chaque dilution ( $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) sont répandus dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MHA supplémenté par les antibiotiques sus-nommés, pour
- 20 culture à 37°C dans des conditions de microaérophilie pendant 4 ou 5 jours. On décompte alors le nombre de bactéries viables. *H. pylori* est identifiée par sa morphologie révélée par une coloration de Gram et par des réactions positives à des tests uréase, catalase et oxidase.

### **25 Analyse de la réponse par ELISA**

- Les analyses par ELISA ont été exécutées conformément au protocole standard (les conjugués biotinylés et la streptavidine peroxydase provenaient de chez Amersham et le substrat OPD de chez Sigma). Les plaques étaient enduites d'extraits *H. pylori* (5  $\mu$ g/ml) dans du tampon carbonate. Un sérum de contrôle de souris dirigé contre
- 30 l'extrait d'*H. pylori* a été introduit dans chaque expérience. Le titre correspond à l'inverse de la dilution donnant une DO de 1,5 à 490 nm.

### **3B - Résultats**

- 35 Avant tout commentaires au sujet des Figures 4 à 7, on note que ces figures présentent les résultats obtenus avec l'antigène utilisé adjuvanté par de la LT et administré par voie intragastrique. Cette expérience est dite expérience de référence

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

standard dans la mesure où l'association de l'art antérieur LT / IG est celle qui donne les meilleurs résultats à ce jour.

### Réponse sérique

- 5 Comme montré dans la Figure 4, après trois immunisations, toutes les souris immunisées par voie sous-cutanée présentent une réponse sérique importante en IgG. Sur la base des rapports IgG1:IgG2a, on remarque que le PCPP induit une réponse prédominante de type Th2 (fort taux IgG1, faible taux IgG2a). Le Bay R1005 et le DC-chol induisent une réponse plus équilibrée de type Th1 / Th2. Enfin le QS-21
- 10 induit une réponse prédominante de type Th1. En fait, la différence principale entre les quatre groupes de souris A1 à A4 réside dans leurs titres IgG2a, les titres IgG1 étant tous similaires.

### Protection après épreuve

- 15 Les Figures 5 à 7 montrent que le niveau de protection dans les groupes A1 et A2 est similaire à ou même meilleur que celui observé dans le groupe de référence (LT). ILs s'agit des groupes ayant reçues les doses d'uréase en présence du QS-21 et du Bay R1005 respectivement. Le groupe A3 (DC-chol) présente un niveau de protection légèrement moindre. Par contre, dans le groupe A4 (PCPP), il n'est pas possible de
- 20 mettre en évidence un effet protecteur important. On note que les résultats présentés dans les Figures 5 à 7 sont consistents entre eux.

- Lorsque l'on met en parallèle les résultats présentés dans la Figure 4 d'une part et les Figures 5 à 7 d'autre part, on est en droit de conclure que l'usage d'un adjuvant capable d'induire une réponse Th1 ou Th1 / Th2 (QS-21, Bay R1005 ou DC-chol)
- 25 favorise la mise en place d'un effet protecteur ; contrairement à l'usage d'un adjuvant de type Th2 (PCPP).

### Exemple 4 : Traitement d'une infection à *H. pylori* chez la souris

- 30 Nous avons comparé l'efficacité de l'immunisation par voie sous-cutanée (SC) par rapport à la voie mucoale afin de soigner une infection à *H. pylori* dans un modèle de souris.
- 35 Des souris OF1 ont été infectées avec  $10^6$  colonies formant plaques (cfu) de la souche d'*H. pylori* ORV2001. Après un mois, on a vérifié que l'infection était bien établie en sacrifiant au hasard 10/100 souris et en testant l'activité uréase sur un quart de la

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

totalité de l'estomac. Les résultats étant tous positifs, nous avons alors immunisé des souris (10 par groupe) 3 fois à 3 semaines d'intervalle, soit par voie sous-cutanée en utilisant 10 µg d'uréase recombinante adjuvée avec 15 µg de QS21 (Aquila) ou 400 µg d'adjuvant Bay R1005 (Bayer), soit par voie orale en utilisant 40 µg d'uréase  
5 mélangée à 1 µg de LT. Pour chacun des deux adjuvants administrés par voie parentérale, l'immunisation a été réalisée soit dans le cou, afin d'atteindre les ganglions lymphatiques de la région supérieure du corps, soit dans la région lombaire afin d'atteindre les ganglions lymphatiques abdominaux. Dix souris ont été laissées non-infectées et non-immunisées (contrôle négatif), alors que les souris du groupe  
10 contrôle positif ont reçu une solution saline, du QS21 ou de l'adjuvant Bay par voie sous-cutanée (région lombaire).

Un mois après la troisième immunisation, toutes les souris ont été sacrifiées et les estomacs prélevés afin d'évaluer l'étendue de la colonisation en mesurant l'activité de  
15 l'uréase (10/10 souris furent analysées dans chaque groupe) ainsi qu'en effectuant une culture quantitative (5/10 souris furent analysées). Les Figures 6A (test portant sur l'uréase) et 6B (culture) montrent que chez les souris immunisées avec l'uréase adjuvée avec du QS21 par voie sous-cutanée dans la région lombaire, l'infection avait quasiment disparu (4/5 souris étaient négatives en culture quantitative). Les souris  
20 immunisées avec l'uréase par voie sous-cutanée dans le cou, en présence de QS21 et les souris recevant l'uréase plus de la LT par voie orale présentaient une diminution de l'infection de 10 à 100 par rapport aux souris non-immunisées. L'adjuvant Bay avait induit une diminution identique, plus prononcée chez les souris immunisées dans la région lombaire.

25 La réalisation d'une histopathologie sur ces mêmes souris n'a pas révélé de gastrite plus importante par rapport aux contrôles.

Comme nous l'avions observé dans notre précédente étude prophylactique (Exemple  
30 1), les souris protégées présentaient un taux sérique élevé des deux isotypes IgG1 et IgG2, ce qui est représentatif d'une réponse équilibrée Th2/Th1. De plus, les souris immunisées par voie sous-cutanée dans la région lombaire présentaient les plus hauts niveaux sériques en IgA, ce qui démontre une réponse mucoale.

35 Ces résultats indiquent que l'immunisation systémique ciblée est capable de guérir une infection à *H. pylori* acquise chez une souris, et que l'utilisation d'adjuvants

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



induisant une réponse mucoale équilibrée de type Th1/Th2 est souhaitable afin d'atteindre ce but.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

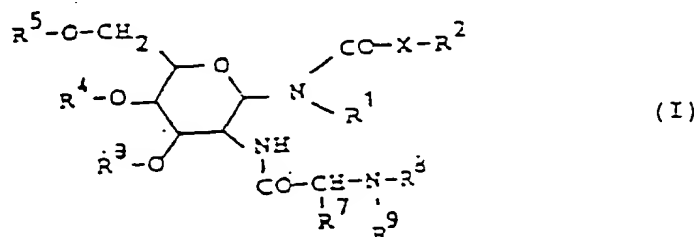
### Revendications

1. Une composition pharmaceutique qui comprend un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et au moins un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 à l'encontre d'*Helicobacter*, sélectionné parmi :

(i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;

(ii) des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; à condition que ces lipides ne soient pas présentés sous forme de liposomes lorsque ladite composition ne contient pas de saponine ni de glycolipopeptide de formule (I) ; et

(iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle

R<sup>1</sup> représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,

X représente -CH<sub>2</sub>-, -O- ou -NH-,

R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> et R<sup>5</sup> représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl-CO-R<sup>6</sup>, dans lequel R<sup>6</sup> représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,

R<sup>7</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,

R<sup>8</sup> représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et

R<sup>9</sup> représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et

R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

2. Une composition selon la revendication 1, qui comprend au moins deux composés ; un premier composé étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et un deuxième composé étant sélectionné parmi des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.
3. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle le composé est une saponine qui est la fraction QS-21 purifiée à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria*.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

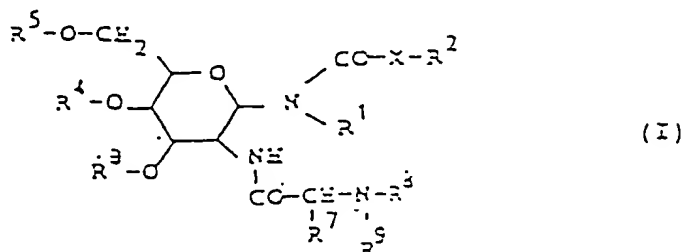
4. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle le composé est un lipide cationique mis sous forme de dispersion.
5. Une composition selon la revendication 1, ou 4, dans laquelle le composé est un lipide cationique qui est le 3-bêta-(N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol) ou un sel de celui-ci.
6. Une composition selon la revendication 1, dans laquelle le composé est un glycolipopeptide qui est le N-(2-L-leucinamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-N-octadecyl-dodecanoylamide (Bay R1005).
7. Une composition selon l'une des revendications 1 à 6, dans laquelle l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.
8. Une composition selon la revendication 7, dans laquelle l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est la sous-unité UreB ou UreA de l'uréase d'*Helicobacter*.
9. Une composition selon l'une des revendications 1 à 8, dans laquelle l'agent immunogène est dérivé d'*Helicobacter pylori*.
10. L'usage d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 à l'encontre d'*Helicobacter*, sélectionné parmi :
  - (i) des saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* ;
  - (ii) des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires ; à condition que ces lipides ne soient pas

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



présentés sous forme de liposomes lorsque ladite composition ne contient pas de saponine ni de glycolipopeptide de formule (I) ; et

(iii) des glycolipopeptides de formule (I) :



dans laquelle

- $R^1$  représente un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- $X$  représente  $-CH_2-$ ,  $-O-$  ou  $-NH-$ ,
- $R^2$  représente un atome d'hydrogène ou un reste alkyle saturé ou insaturé une ou plusieurs fois et comportant de 1 à 50 atomes de carbone,
- $R^3$ ,  $R^4$  et  $R^5$  représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou un reste acyl- $CO-R^6$ , dans lequel  $R^6$  représente un reste alkyle ayant de 1 à 10 atomes de carbone,
- $R^7$  représente un atome d'hydrogène, un groupe alkyle en  $C_1-C_7$ , hydroxyméthyle, 1-hydroxyéthyle, mercaptométhyle, 2-(méthylthio)-éthyle, 3-aminopropyle, 3-uréido-propyle, 3-guanidylpropyle, 4-aminobutyle, carboxyméthyle, carbamoylméthyle, 2-carboxéthyle, 2-carbamoyléthyle, benzyle, 4-hydroxybenzyle, 3-indolylméthyle ou 4-imidazolylméthyle,
- $R^8$  représente un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- $R^9$  représente un atome d'hydrogène, un groupe acétyle, benzoyle, trichloracétyle, trifluoracétyle, méthoxycarbonyle, t-butyloxycarbonyle ou benzyloxycarbonyle, et

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> peuvent, quand ils sont pris ensemble, représenter un groupe -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ;

dans la fabrication d'une composition pharmaceutique capable d'induire une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter* et destinée au traitement ou à la prévention des infections à *Helicobacter*.

11. L'usage selon la revendication 10, d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'au moins deux composés ; un premier composé étant sélectionné parmi les saponines purifiées à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria* et un deuxième composé étant sélectionné parmi des lipides cationiques ou un sel de ces derniers ; lesdits lipides étant des inhibiteurs faibles de la protéine kinase C et possédant une structure qui inclut un groupe lipophile dérivé du cholestérol, un groupe de liaison sélectionné parmi les carboxyamides et les carbamoyls, un bras espaceur consistant en une chaîne alkyle linéaire, branchée ou non, de 1 à 20 atomes de carbone, et un groupe amine cationique sélectionné parmi les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires.
12. L'usage selon la revendication 10, dans lequel le composé est une saponine qui est la fraction QS-21 purifiée à partir d'un extrait de *Quillaja saponaria*.
13. L'usage selon la revendication 10, dans lequel le composé est un lipide cationique mis sous forme de dispersion.
14. L'usage selon la revendication 10 ou 13, dans lequel le composé est le 3 bêta - (N-(N',N'-diméthyl aminoéthane)-carbamoyl) cholestérol (DC-chol) ou un sel de celui-ci.
15. L'usage selon la revendication 10, dans lequel le composé est un glycolipopeptide qui est le N-(2-L-leucinamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-N-octadécyl-dodécanylamide (Bay R1005).
16. L'usage selon l'une des revendications 10 à 15, dans lequel la réponse immune de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée par un rapport des

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 20 ; les IgG2a et IgG1 étant des immunoglobulines induites à l'encontre d'*Helicobacter*.

17. L'usage selon la revendication 16, dans lequel la réponse immune de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 10.
18. L'usage selon la revendication 17, dans lequel la réponse immune de type Th1 est mesurée chez la souris et est caractérisée par un rapport des titres ELISA IgG2a : IgG1 supérieur ou égal à 1 : 2.
19. L'usage selon l'une des revendications 10 à 18, dans lequel l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est sélectionné parmi une préparation de bactéries *Helicobacter* inactivées, un lysat cellulaire d'*Helicobacter*, un peptide et un polypeptide d'*Helicobacter* sous forme purifiée.
20. L'usage selon la revendication 19, dans lequel l'agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* est la sous-unité UreB ou UreA de l'uréase d'*Helicobacter*.
21. L'usage selon l'une des revendications 10 à 20, dans lequel l'agent immunogène est dérivé d'*Helicobacter pylori*.
22. L'usage selon l'une des revendications 10 à 21, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique.
23. L'usage selon la revendication 22, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique stricte.
24. L'usage selon la revendication 22 ou 23, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique dans la partie d'un mammifère, notamment d'un primate située sous son diaphragme.
25. L'usage selon l'une des revendications 22 à 24, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par voie systémique dans la région dorso-lombaire d'un mammifère, notamment d'un primate.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

26. L'usage selon l'une des revendications 22 à 25, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée par une voie systémique sélectionnée parmi la voie sous-cutanée, la voie intramusculaire et la voie intradermique.
27. L'usage selon l'une des revendications 10 à 26, dans lequel la composition pharmaceutique est destinée à être administrée deux ou trois fois par voie systémique au cours d'un même traitement, afin de prévenir ou de traiter une infection à *Helicobacter*.
28. L'usage conjoint d'un agent immunogène dérivé d'*Helicobacter* et d'un composé capable de favoriser l'induction d'une réponse immune de type T-helper 1 (Th1) à l'encontre d'*Helicobacter*, dans la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée à être administrée par voie systémique pour prévenir ou traiter une infection à *Helicobacter*.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PM9706 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/00875	International filing date (day/month/year) 30 April 1998 (30.04.1998)	Priority date (day/month/year) 30 April 1997 (30.04.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/106		
Applicant MERIEUX ORAVAX		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>43</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 25 November 1998 (25.11.1998)	Date of completion of this report 28 July 1999 (28.07.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/00875

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages 1-35, filed with the letter of 10 May 1999 (10.05.1999),  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1-28, filed with the letter of 10 May 1999 (10.05.1999),  
 Nos. 99, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/8, 2/8, 4/8-8/8, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig 3/8, filed with the letter of 10 May 1999 (10.05.1999),  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/00875

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 10-28

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 10-28 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See separate box

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The subject matter of Claims 10 to 28 is considered by this Authority to be covered by PCT Rule 67.1(iv). Consequently, no opinion can be given regarding the industrial applicability of the subject matter of these claims (PCT Article 34(4)(a)(i)).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-96 31235

D2: WO-A-88 09336

D3: EP-A-0 206 037

D4: WO-A-93 05162

D5: MOHAMMADI ET AL.: "HELICOBACTER-SPECIFIC CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES DISPLAY A PREDOMINANT TH1 PHENOTYPE AND PROMOTE A DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY RESPONSE IN THE STOMACHS OF MICE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.156, 1996, pages 4729-4738.

D6: D'ELIOS ET AL.: "T HELPER 1 EFFECTOR CELLS SPECIFIC FOR HELICOBACTER PYLORI IN THE GASTRIC ANTRUM OF PATIENTS WITH PEPTIC ULCER DISEASE" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.158, 15 January 1997, pages 962-967.

1. Document D1, which is considered to be the prior art closest to the subject matter of Claim 1, describes a pharmaceutical composition for inducing a protective immune response to an antigen in a mucosal effector site in a host mammal, said composition comprising two or three identical or

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

different products (inductor agents), the formulation of which is suitable for the envisaged administration (cf. abstract). The product can be an immunogen agent of *Helicobacter pylori*, for example the ureA or ureB subunit of its urease, or a DNA fragment coding for an *H.pylori* antigen (p.14, lines 28 to 38).

This immunogen agent (protein or DNA can be presented as a liposomal formulation (Examples 3 to 5, in particular DC-Chol liposomes in Example 5) or otherwise (p.14, l.16).

The subject matter of Claim 1 therefore differs from this known composition in that it contains, in addition to the immunogen agent derived from *Helicobacter*, at least a compound which can promote the induction of an immune response of the type T-helper 1 to *Helicobacter* selected from among:

- saponins purified from an extract of *Quillaja saponaria*
- glycolipopeptides of formula (I)
- cationic lipids as described in (ii), which may be in the form of liposomes provided that the composition also comprises a saponin and/or a glycolipopeptide as defined above.

The subject matter of Claim 1 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

The problem to be solved by the subject matter of Claim 1 can therefore be considered to be that of providing an alternative pharmaceutical composition comprising an immunogen agent derived from *Helicobacter*.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Knowing that the induction of a predominant Th1 or balanced Th1/Th2 response was considered to be harmful and undesirable (cf. D5 and D6, abstracts), a person skilled in the art would not have used these compounds to solve the problem posed.

The solution proposed in Claim 1 of the present application is therefore considered inventive (PCT Article 33(3)).

2. Claims 2 to 9 depend on Claim 1 and therefore also satisfy *per se* the requirements of the PCT as regards novelty and inventive step.
3. Document D1, which is considered to represent the most relevant prior art, discloses a pharmaceutical composition from which the subject matter of Claim 10 differs in that it contains a compound able to induce a Th-1 type immune response to *Helicobacter*.

The subject matter of Claim 10 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

The problem to be solved by the subject matter of this claim can therefore be considered to be that of providing an alternative pharmaceutical composition comprising an immunogen agent derived from *Helicobacter*.

The solution to this problem proposed in Claim 10 of the present application is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)) for the same reasons as stated in paragraph 1 above.

4. Claims 11 to 27 are dependent on Claim 10 and

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

therefore also satisfy *per se* the requirements of the PCT as regards novelty and inventive step.

5. The content of Claim 28 is novel and inventive (PCT Article 33(1) to (3)) for the same reasons as those relating to Claim 10 (paragraph 3 above).
6. The PCT does not contain any uniform criteria for assessing whether Claims 10 to 28 are industrially applicable. Patentability can also depend on the manner in which the claims have been worded. Thus, the European Patent Office does not consider the subject matter of claims for the use of a compound for medical purposes to be industrially applicable. By contrast, claims relating to a known compound are acceptable for a first use for medical purposes, as are claims relating to the use of such a compound in the production of medication for a novel form of medical treatment.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Figure 2 corresponds neither to its description (p.20, lines 10 to 17), nor to the comments made on page 25, lines 24 to 30.
2. The polyphosphazene (PCPP), which enables an IgG2a titer of 26200 to be obtained, is not considered to be a useful adjuvant for the induction of a Th-1 response (page 26, table and lines 19 to 23; page 33, lines 24 to 32). This is not consistent with the statement made on page 10, lines 11 to 14.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The use of DC-Chol liposomes as a single adjuvant (Example 1) is not consistent with the features of compound (ii) of Claim 10.

This lack of consistency between the claims and the description gives rise to doubt as regards the subject matter for which protection is sought. The claims are therefore unclear (PCT Article 6).

THIS PAGE BLANK (USPTO)